



# Etude de l'interaction entre les ros et la voie mtorc1 dans la régulation de la balance énergétique

Magali Haissaguerre

## ► To cite this version:

Magali Haissaguerre. Etude de l'interaction entre les ros et la voie mtorc1 dans la régulation de la balance énergétique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0206 . tel-01359186

**HAL Id: tel-01359186**

**<https://theses.hal.science/tel-01359186>**

Submitted on 2 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité - Neurosciences

---

Magali Haissaguerre

# **ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE LES ROS ET LA VOIE mTORC1 DANS LA REGULATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE**

**Sous la direction de Mr le Pr Antoine Tabarin**

Soutenue publiquement le 15 décembre 2015

---

## **Membres du jury :**

|                                   |   |                           |
|-----------------------------------|---|---------------------------|
| <b>Mme. LAYE Sophie Dr.</b>       | <i>Université de Bordeaux, France</i> ..... | <b>Président</b>          |
| <b>Mme. LELOUP Corinne Pr.</b>    | <i>Université de Dijon, France</i> .....    | <b>Rapporteur</b>         |
| <b>Mme. BOUSQUET Corinne Dr.</b>  | <i>Université de Toulouse, France</i> ..... | <b>Rapporteur</b>         |
| <b>Mme GUIBERT Christelle Dr.</b> | <i>Université de Bordeaux, France</i> ..... | <b>Examineur</b>          |
| <b>Mme COTA, Daniela Dr.</b>      | <i>Université de Bordeaux, France</i> ..... | <b>Examineur</b>          |
| <b>Mr TABARIN, Antoine Pr.</b>    | <i>Université de Bordeaux, France</i> ..... | <b>Directeur de thèse</b> |

## **Titre :**

**Etude de l'interaction entre les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et la voie mTORC1 dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique.**

## **Résumé :**

La voie de signalisation mTORC1 hypothalamique (mammalian target of rapamycin complexe 1) intègre les signaux hormonaux et nutritionnels. La disponibilité des nutriments module les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) qui régulent l'activité des neurones à proopiomélanocortine (POMC). La modulation de la prise alimentaire induite par les ROS pourrait impliquer mTORC1.

Des souris C57Bl6J et wild-type (WT) ou invalidées pour S6K1 (S6K1-KO), principale protéine cible de mTORC1, ou invalidées pour raptor, protéine clé de mTORC1, sélectivement au niveau des neurones anorexigènes POMC (POMC-raptor-KO) ont été traitées par injections intracérébroventriculaires (ICV) d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'honokiol (piégeur de ROS), uniques ou combinées avec un inhibiteur de mTOR (rapamycine) ou un activateur de mTOR (leptine).

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV induit une augmentation de l'activité hypothalamique mTORC1, de l'activation neuronale du noyau arqué, de l'expression des ROS dans les neurones POMC, associée à une diminution de la prise alimentaire et du poids. Cet effet anorexigène est diminué chez les souris S6K1-KO, chez les C57Bl6J après administration de rapamycine, et chez les POMC-raptor-KO.

L'honokiol ICV bloque l'effet anorexigène de la leptine, suggérant que cet effet soit dépendant des ROS. La leptine ICV entraîne une augmentation des ROS dans les neurones POMC des souris C57Bl6J et POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO.

Nos résultats montrent que la régulation de la prise alimentaire induite par les ROS nécessite une voie mTORC1 fonctionnelle et que l'effet anorexigène de la leptine nécessite une augmentation de ROS, mTORC1 dépendante, au niveau des neurones POMC.

**Mots clés :** Hypothalamus ; Espèces réactives dérivées de l'oxygène ; mTORC1 ;

Leptine ; Prise alimentaire

---

## **Title :**

**Study of the interaction between Reactive Oxygen Species (ROS) and the mTORC1 pathway in the hypothalamic regulation of energy balance.**

## **Abstract :**

The mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway is an important hypothalamic integrator of nutrients and hormones. Nutrient availability also affects the reactive oxygen species (ROS) in proopiomelanocortin (POMC) neurons and regulates neuronal activity. We hypothesize that modulation of mTORC1 activity mediates ROS effects on food intake.

To this purpose, C57Bl6J mice or WT mice and their KO littermates either deficient for the mTORC1 downstream target S6K1 or for the mTORC1 component raptor specifically in POMC neurons (POMC-raptor-KO) were treated with an intracerebroventricular (ICV) injection of the ROS producer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or the ROS scavenger honokiol, alone or in combination with the mTOR inhibitor rapamycin or the mTOR activator leptin.

ICV H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced phosphorylation of S6K1 within the hypothalamus, increased expression of c-fos, a marker of neuronal activity, in the arcuate nucleus and increased ROS in POMC neurons. These effects were associated with a significant decrease in food intake. The anorexigenic effect of ICV H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not seen in S6K1-KO mice, in C57Bl6J mice co-treated with rapamycin (an mTOR inhibitor) and in POMC-raptor-KO mice.

Similarly, ICV honokiol administration combined with a leptin injection blunted the anorexigenic effect of leptin, suggesting that leptin requires ROS formation to reduce FI. ICV administration of leptin increased ROS in POMC neurons in C57Bl6J and POMC-raptor-WT mice, but not in POMC-raptor-KO mice.

Our results demonstrate that ROS modulators require a functional mTORC1 pathway to regulate food intake and that leptin needs an mTORC1-dependent increase in ROS levels in POMC neurons to decrease food intake.

## **Keywords :**

Hypothalamus ; Reactive Oxygen Species ; Mammalian target of rapamycin complex 1; Leptin ; Food intake

---



## **UNITE DE RECHERCHE**

Physiopathologie de la plasticité neuronale - U 862

### **Adresse du laboratoire:**

NeuroCentre Magendie

INSERM U862

Equipe Dr Daniela COTA

Groupe “Physiopathologie de l’équilibre énergétique et obésité”

146, rue Léo Saignat

33077 Bordeaux Cedex

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Daniela Cota et le Pr Tabarin qui ont co-dirigé cette thèse.

### **Dr Daniela Cota**

Madame le Dr Daniela Cota, first I want to thank you for the 3 years that I spent in your lab. Thank you for making me feel so welcome ! I really enjoyed working with you and you have taught me a lot. I really appreciate your rigorous, your direct attitude and the fact that you are always available to answer questions and give advices even in times of stress ! Thanks a lot !

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères.

### **Pr Antoine Tabarin**

Monsieur le Pr Tabarin, c'est la deuxième fois cette année que je vous remercie pour vos précieux conseils, votre rigueur et votre disponibilité au cours des différentes étapes de mon internat. Je vous remercie également pour votre soutien constant dans ma volonté de me former à l'onco-endocrinologie ou plutôt à l'endocrino-oncologie comme vous aimez le souligner. Votre pédagogie, vos qualités d'orateur et vos capacités de discussion constituent des qualités rares et précieuses.

Je vous remercie de m'avoir offert l'opportunité de découvrir la recherche fondamentale et d'avoir allégé mon emploi du temps hospitalier pour finir ce travail.

Je suis heureuse d'être revenue travailler dans le service et j'espère me montrer à la hauteur de vos attentes dans les années à venir.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères.

Je tiens également à remercier les rapporteurs et les membres du jury.

### **Dr Sophie Layé**

Madame le Dr Sophie Layé, je vous remercie d'avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse, après avoir été ma tutrice au cours de la thèse. Merci pour votre attention et pour votre gentillesse lors de nos entretiens.

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération.

### **Pr Corinne Leloup**

Madame le Pr Corinne Leloup, je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail, d'être venue à la soutenance malgré la distance et votre emploi du temps surchargé. Merci d'apporter à ce travail votre jugement expert dans le domaine des ROS hypothalamiques. Je suis particulièrement honorée de vous compter parmi les juges.

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération.

### **Dr Corinne Bousquet**

Madame le Dr Corinne Bousquet, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail, d'avoir la gentillesse de venir à la soutenance et d'apporter à ce travail votre expertise dans le domaine de mTOR. J'ai gardé un très bon souvenir de notre travail collectif sur l'implication de mTOR et des récepteurs à la somatostatine dans les tumeurs neuroendocrines, qui constituent un domaine particulièrement intéressant à mes yeux.

Soyez assurée de mes plus vifs remerciements et de ma respectueuse considération.

## **Dr Christelle Guibert**

Madame le Dr Christelle Guibert, je vous remercie d'avoir accepté de lire et de juger ce travail dont la thématique est un peu différente de la votre. Merci d'apporter à ce travail votre jugement expert dans le domaine des ROS. Merci aussi d'avoir accepté de participer à la mi-thèse et d'avoir apporté régulièrement votre aide au cours de ces 3 années, en particulier sur la délicate question de la mesure des ROS.

Soyez assurée de mes plus vifs remerciements et de ma respectueuse considération.

## **Enfin, je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire et les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.**

Un merci particulier pour **Caroline** pour m'avoir appris tout plein de techniques, pour tous les moments partagés et pour la réassurance en toute circonstance. I missed you and I wish you the best. You 2 deserve it ! Keep in touch !

A special thank you to **Samantha**, my favourite english friend, for helping me so much, keeping a very strong sense of humor in any circumstance. Thank you for your serene attitude. I will try to do it as well. I will miss our little chats in frenchanglais ! see you at the zumba !

Un merci sincère à **Amandine** qui aura passé cette dernière année de thèse à mes côtés. Merci pour ta positive attitude et ton efficacité ! en attendant de retravailler ensemble dans un contexte différent !

Merci aussi à **Omar** pour son aide et sa disponibilité permanente malgré ses différentes manips ... good luck in Mexico my friend !

Merci aussi à **Nicolas** pour son aide, en particulier concernant les cages métaboliques et la fameuse double immuno pS6-POMC ... je croise les doigts !

Merci à **Nathalie** qui m'a aidée as much as possible, toujours avec le sourire !

Merci à **Fabrice Cordelières** qui m'a énormément aidée pour la quantification du DHE, un vrai challenge ! le tout avec une patience à toute épreuve et une disponibilité remarquable ! merci beaucoup, grâce à toi je n'ai plus peur des microscopes !

Merci à **Giovanni Bénard** pour m'avoir appris les bases de l'oxygraphie même si les subtilités de cette technique restent à perfectionner ...

Merci à **Lucie Desmoulin**, thésarde à Dijon, pour m'avoir aidée à mettre au point l'oxygraphie sur des échantillons hypothalamiques de souris et aussi pour les discussions sur le DHE, ce composé qui donne du fil à retordre ...

Merci à toute l'équipe pour tous les bons moments partagés : Wilfrid, ses petites blagues et le smile calme et gentil en toutes circonstances (wish you the best for 2016) ; Cécile et Vincent et leurs glouglous, qui ont amené respectivement leur punchy et geeky attitudes dans le bureau des thésards (merci pour le petit bouddha avec mutation pome) ; Wahiba; Elke et son rire tonitruant ; Caterina de Catania; Javier pour tout ce qu'il m'a appris concernant les îlots pancréatiques; Giulia et ses cours de maquillage ; Didier et nos discussions existentielles; Camille ; Bruno Aouizerate ; merci à Blandine Gatta-Chérifi pour le soutien bienveillant et une sollicitude solidaire qui fait du bien !

## **PREAMBULE**

Cette thèse de science a été réalisée dans le cadre du programme MD-PhD de l'Université et du Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux.

Elle s'inscrit dans le cadre d'une formation médicale initiale en endocrinologie avec une spécialisation en cancérologie endocrinienne. Le but de ce travail était d'acquérir une organisation de la pensée et une démarche scientifique permettant à un médecin d'optimiser les méthodes de recherche clinique, de développer une culture scientifique et d'apprendre comment répondre à une problématique donnée en utilisant différentes techniques et différents abords.

Durant cette thèse en Neurosciences, plusieurs travaux de recherche clinique ont été menés sur des thématiques variées telles que les phéochromocytomes, les syndromes de Cushing ACTH indépendants (hyperplasie des surrénales et adénomes cortisoliques) ou encore les cancers thyroïdiens réfractaires à l'iode. Les publications et communications orales ou affichées qui en résultent sont précisées dans les pages suivantes.

La thèse de Médecine a été réalisée sous la direction du Pr Schumberger à l'Institut Gustave Roussy et a été présentée le 13 octobre 2015 avec la mention très honorable et les félicitations du jury. Elle fait l'objet d'un article qui est en cours d'écriture pour le journal « Thyroid ».

La thèse de Science a été divisée en 2 thématiques indépendantes.

La première partie concerne la recherche d'une interaction entre la voie mTORC1 et les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire. Les résultats ont permis la rédaction d'un article qui est actuellement en cours de soumission au « Journal of Neuroscience ».

La seconde partie concerne l'étude des effets métaboliques de l'inhibition pharmacologique de la voie Jak/STAT chez les souris C57Bl6J. A partir de données cliniques chez des patients traités pour une hémopathie par un inhibiteur de Jak, nous avons cherché à préciser l'implication de la voie Jak/Stat dans la régulation de la balance énergétique. Compte tenu de la différence de thématique et des limites des résultats, nous avons choisi d'inclure cette partie dans les travaux annexes.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du CHU de Bordeaux, de l'INSERM, du Groupe des Tumeurs Endocrines, de l'Université de Bordeaux et du Labex Brain et grâce au Dr Daniela Cota et au Pr Antoine Tabarin.

## LISTE DES PUBLICATIONS

### ARTICLES PUBLIES

- **Haissaguerre M.**, Courel M., Caron P., Denost S., Dubessy C., Gosse P., Apavouppouille V., Belleannée G., Jullié M-L., Montero-Hadjadje M., Yon L., Corcuff J-B., Fagour C., Mazerolles C., Wagner T., Nunes M-L., Anouar Y. & Tabarin A. Normotensive incidentally discovered pheochromocytomas display specific biochemical, cellular and molecular characteristics. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2013; 98(11) :4346-54.
- **Haissaguerre M.**, Tabarin A. Les musts de l'Endocrine « Génétique des tumeurs surrénaliennes ». Annales d'Endocrinologie. 2014
- **Haissaguerre M.**, Saucisse N, Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. Molecular and Cellular Endocrinology 2014
- Lafond M, Fagour C, **Haissaguerre M.**, Darancette G; Wagner T, Rault A, Tabarin A. Hemodynamic Instability during surgical resection of normotensive incidentally discovered pheochromocytomas. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2014
- Bermudez-Silva FJ, Romero-Zerbo SY, **Haissaguerre M.**, Ruz-Maldonado I, Tabarin A, Marsicano G, Cota D. Cannabinoid CB1 receptors and mTORC1 signalling pathway interact to modulate glucose homeostasis. Accepté à Disease Models & Mechanisms 2015

### ARTICLES SOUMIS OU EN PREPARATION

- **Haissaguerre M.**, Leboulleux S, Bonichon F, Borget I, Chougnet C, Al Ghuzlan A, Hartl D, Mirghani H, Deandreis D, Baudin E, Schlumberger M. Impact of molecular targeted therapies in patients with bone metastases of differentiated thyroid carcinoma. Article en préparation
- **Haissaguerre M.**, Ferriere A, Clark S, Guzman-Quevedo P, Tabarin A, Cota D. The potent role of mTORC1 in the modulation of food intake induced by the hypothalamic reactive oxygen species. Article en cours de soumission à Journal of Neuroscience
- Velayoudom-Cephise F-L, **Haissaguerre M.**, Tabarin A. Etiopathogeny of primary adrenal hypercortisolism. Article en cours de soumission à Frontiers in Endocrinology
- **Haissaguerre M.**, Ferriere A, Saucisse N, Guzman-Quevedo O, Cota D, Tabarin A. The metabolic effects of a jak 2 inhibitor. Article en préparation

## COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHEES

- **Haissaguerre M**, Ferriere A, Guzman-Quevedo O, Tabarin A, Cota D. « Rôle de la voie mTORC1 et des espèces réactives dérivées de l'oxygène dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique ». *Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Octobre 2015 (poster et présentation orale de poster)*
- Guzman-Quevedo O, Ferretti G, Andre C, Clark S, Dupuy N, **Haissaguerre M**, Leste-Lasserre T, Cota D. « Improvement of the obese phenotype by chronic central administration of the chemical chaperone TUDCA is linked to microglia proliferation in the hypothalamus of mice ». *Congrès World Congress on Neuroscience. Juillet 2015. Rio de Janeiro, Brésil (poster)*.
- **Haissaguerre M**, James S, Tabarin A, Cota D. « Study for the interaction between Reactive Oxygen Species and the mTORC1 pathway in the regulation of energy balance ». *European Congress of Endocrinology, Mai 2015 (poster)*
- **Haissaguerre M** « Gestion des effets métaboliques des thérapies ciblées » participation en tant qu'oratrice à la journée régionale de formation des infirmières en oncologie organisée par le Dr Denis Smith et Novartis, *décembre 2014*
- **Haissaguerre M**, Cota D « Effets métaboliques des thérapies ciblées. Application aux inhibiteurs de Jak 2 » prix IPSEN, congrès du GTE, *décembre 2014*
- **Haissaguerre M**, Tabarin A. Musts de l'Endocrinologie : pathologies surrénaliennes (Endocrine, 2014), *congrès de la SFE, novembre 2014 (communication orale)*
- Lafond M, **Haissaguerre M**, Fagour C, Darancette G, Wagner T, Rault A, Tabarin A. Hemodynamic Instability during surgical resection of normotensive incidentally discovered pheochromocytomas. *Annual conference of the Endocrine Society, Juin 2014 (poster)*
- **Haissaguerre M**, Clark S, Cota D. Study of a possible interaction between the reactive oxygen species and the mTORC1 pathway in the energy balance regulation. *Journée Ecole Doctorale Université de Bordeaux, Avril 2014 et Avril 2015 (posters)*
- **Haissaguerre M**, Courel M, Caron P, Denost S, Dubessy C, Gosse P, Apavouppouille V, Belleannée G, Jullié M-L, Montero-Hadjadje M, Yon L, Corcuff J-B, Fagour C, Mazerolles C, Wagner T, Nunes M-L, Anouar Y, Tabarin A. Incidentally discovered pheochromocytomas : heterogenous tumors with specific clinical, biochemical, cellular and molecular characteristics. *Congrès de la SFE, Octobre 2013 (prix Novartis de la meilleure communication orale SFE 2013)*
- Bermudez-Silva FJ, Romero-Zerbo SY, **Haissaguerre M**, Ruz-Maldonado I, Tabarin A, Marsicano G, Cota D. Cannabinoid CB1 receptors and mTORC1 signalling pathway interact to modulate glucose homeostasis. *Meeting de European Association for the Study of Diabetes (EASD), Septembre 2013 (poster)*
- **Haissaguerre M**, Leboulleux S, Bonichon F, Borget I, Chougnat C, Al Ghuzlan A, Hartl D, Baudin E, Schlumberger M. Impact of molecular targeted therapies in patients with bone metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Meeting de l'American Thyroid Association (ATA), Septembre 2012 (communication orale)*

## ABREVIATIONS

**4-EBP1** : eIF4E binding protein 1  
 **$\alpha$ -MSH** : hormone stimulant les mélanocytes ( $\alpha$  -melanocyte stimulating hormone)  
**ACC** : acétyl-coA carboxylase  
**ADP** : adénosine-5'-diphosphate  
**AG** : acides gras  
**AgRP** : agouti gene related peptide  
**AHA** : aire hypothalamique antérieure  
**AMP** : adénosine monophosphate  
**AMPK** : protéine kinase activée par l'AMP  
**ANOVA** : mesure de variance  
**aPV** : noyau périventriculaire de l'hypothalamus  
**ARC** : noyau arqué de l'hypothalamus  
**ARNm** : acide ribonucléique messenger  
**ATP** : adénosine tri-phosphate  
**ATPase** : ATP synthase  
**CART** : cocaine, amphetamine regulated transcript  
**CCK** : cholécystokinine  
**CPT-1 $\beta$**  : carnitine palmitoyltransferase 1  $\beta$   
**Cre** : cre-recombinase  
**CRM** : chaîne respiratoire mitochondriale  
**Deptor** : DEP-domain-containing mTOR interacting protein  
**DHE** : dihydroéthidium  
**DIO** : diet-induced obesity ou obésité induite par l'alimentation  
**DMH** : noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
**DMSO** : diméthyl sulfoxyde  
**ERK** : extracellular signal-regulated kinase  
**FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazine  
**FoxO1** : forkhead box O transcription factor  
**GABA** : acide  $\gamma$  aminobutyrique  
**GFP** : green fluorescent protein  
**GK** : glucokinase  
**GLP-1** : peptide libérant la ghréline  
**GLUT** : transporteur du glucose  
**GPx** : glutathion peroxydase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène  
**HFD** : régime enrichi en graisses (high fat diet)  
**HIF** : hypoxic inducing factor (facteur induit par l'hypoxie)  
**ICV** : intracérébroventriculaire  
**IL** : interleukine  
**IR** : récepteur à l'insuline

**IRS** : insulin receptor substrate  
**IP** : intrapéritonéal  
**KO** : knock-out (délété)  
**LH** : aire hypothalamique latérale  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**MAPK** : mitogen activated protein kinase  
**MCR** : récepteur aux mélanocortines  
**mTOR** : cible de la rapamycine chez les mammifères  
**mTORC1/mTORC2** : complexe 1/2 de mTOR  
**NFκB** : facteur nucléaire κB  
**NPY** : neuropeptide Y  
**NTS** : noyau du tractus solitaire  
**O<sub>2</sub>** : oxygène ou dioxygène  
**ObR** : forme longue du récepteur à la leptine  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PGC-1α** : peroxisome proliferator gamma Co activator 1 alpha  
**PKA** : protéine kinase A  
**PI3K** : phosphatidylinositol-3-OH kinase  
**POMC** : pro-opiomélanocortine  
**PPAR γ** : peroxisome proliferator activated receptor gamma  
**PRAS40** : prolin-rich Akt substrate  
**PTP1B** : phosphotyrosine phosphatase 1B  
**PVN** : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
**Raptor** : regulatory-associated protein of mTOR  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**RER** : quotient respiratoire  
**Rictor** : rapamycin-insensitive companion of mTOR  
**ROS** : espèces réactives dérivées de l'oxygène  
**ROS<sub>m</sub>** : ROS mitochondriaux  
**S6** : ribosomal protein S6  
**S6K** : ribosomal protein S6 kinase  
**SCN** : noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus  
**SOCS3** : suppressor of cytokine signaling 3  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**STAT3** : signal transducer and activator of transcription 3  
**TG** : triglycérides  
**UCP** : uncoupling protein ou protéine découplante  
**VMN** : noyau ventromédian de l'hypothalamus  
**VTA** : aire tegmentale ventrale  
**Wnt** : Wint  
**WT** : wild-type (sauvage)



## LISTE DES FIGURES

### Introduction

**Figure 1.** Les différentes sources intracellulaires d'ATP.

**Figure 2.** La phosphorylation oxydative.

**Figure 3.** Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale.

**Figure 4.** Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS).

**Figure 5.** L'homéostasie redox.

**Figure 6.** Production mitochondriale des ROS.

**Figure 7.** La régulation de la production des ROS mitochondriales.

**Figure 8.** La voie de signalisation mTORC1.

**Figure 9.** Localisation anatomique des différents noyaux hypothalamiques.

**Figure 10.** La régulation hypothalamique de la balance énergétique.

**Figure 11.** Voies de signalisations intracellulaires activées par la leptine ou l'insuline au niveau des neurones du noyau arqué.

**Figure 12.** Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la balance énergétique.

**Figure 13.** Le rôle de la voie mTORC1 au niveau hypothalamique.

**Figure 14.** Le rôle de l'AMPK dans la régulation de la balance énergétique.

**Figure 15.** Les ROS modulent la prise alimentaire et l'activité neuronales des neurones POMC et NPY/AgRP au niveau de l'ARC.

**Figure 16.** L'utilisation différentielle des sources d'énergie (glucose ou acides gras) par les neurones POMC et NPY/AgRP modifie la régulation des ROS au niveau cellulaire.

**Figure 17.** Effets du statut métabolique sur le métabolisme mitochondrial et la production de ROS au niveau des neurones POMC et NPY/AgRP.

### Résultats

**Figure 18.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue la prise alimentaire et le poids corporel chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

**Figure 19.** L'administration aigue d'honokiol ICV augmente la prise alimentaire 1h après l'injection, mais n'a pas d'effet sur le poids corporel à 24h chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

**Figure 20.** Représentation de la fluorescence du DHE au niveau de l'ARC en cas d'administration IP ou IV.

**Figure 21.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV augmente l'expression de c-fos au niveau du noyau arqué hypothalamique chez les souris C57Bl6J.

**Figure 22.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV augmente l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

**Figure 23.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV augmente l'activation de la voie mTORC1 hypothalamique chez les souris C57Bl6J.

**Figure 24.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue la prise alimentaire et le poids corporel chez les souris S6K1-WT, mais pas chez les souris S6K1-KO.

**Figure 25.** L'administration aigue d'honokiol ICV diminue la prise alimentaire 1h après l'injection, chez les souris S6K1-WT, mais pas chez les souris S6K1-KO.

**Figure 26.** L'administration concomitante de rapamycine et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV lève l'inhibition de la prise alimentaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les souris C57Bl6J nourries avec un régime standard.

**Figure 27.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue la prise alimentaire et le poids corporel des souris POMC-raptor-WT, mais n'a pas d'effet chez les POMC-raptor-KO.

**Figure 28.** L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO.

**Figure 29.** L'administration concomitante d'honokiol et de leptine diminue l'effet anorexigène de la leptine chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

**Figure 30.** L'administration aigue de leptine ICV augmente l'expression des ROS dans les neurones POMC des souris C57Bl6J.

**Figure 31.** L'administration aigue de leptine ICV modifie la consommation en oxygène des tissus hypothalamiques de souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

**Figure 32.** L'administration aigue de leptine ICV diminue la prise alimentaire et le poids corporel chez les souris POMC-raptor-WT, mais n'a pas d'effet chez les POMC-raptor-KO.

**Figure 33.** L'administration aigue de leptine ICV diminue l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-WT, mais n'a pas d'effet chez les POMC-raptor-KO.

**Figure 34.** Synthèse des résultats.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>. TABLE DES MATIERES</b>  |           |
| <b>. INTRODUCTION GENERALE .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>. PARTIE 1. Le métabolisme des nutriments est source d'énergie intracellulaire .....</b>      | <b>5</b>  |
| <b>I. Les différentes sources d'énergie.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1. Le métabolisme des nutriments .....   | 6         |
| a) Le glucose .....  | 6         |
| b) Les lipides .....   | 7         |
| c) Les acides aminés.....  | 7         |
| 2. La phosphorylation oxydative.....   | 7         |
| <b>II. La production physiologique des ROS résulte du métabolisme des nutriments .....</b>       | <b>10</b> |
| 1. Généralités. ....   | 10        |
| a) Sources mitochondriales de ROS.....   | 13        |
| b) Sources non mitochondriales de ROS .....  | 14        |
| 2. Les voies de signalisation activées par les ROS .....   | 14        |
| 3. La régulation des concentrations intracellulaires des ROS.....                                | 15        |
| a) La régulation de la production mitochondriale des ROS .....                                   | 16        |
| b) La régulation de la phosphorylation oxydative.....  | 17        |
| (i) Par la consommation d'ATP (intensité respiration) .....                                      | 17        |
| (ii) Par le découplage de la phosphorylation oxydative (protéines UCP) .....                     | 17        |
| (iii) Par les ROS (rétrocontrôle) .....  | 18        |
| c) Les systèmes anti-oxydants par détoxification directe des ROS.....                            | 18        |
| (i) Les enzymes anti-oxydantes .....   | 18        |
| (ii) Les piègeurs de ROS .....   | 19        |
| <b>III. L'implication de la voie mTORC1 dans le métabolisme physiologique des nutriments .</b>   | <b>19</b> |
| 1. Généralités .....   | 19        |
| 2. La voie de signalisation intracellulaire mTORC1 .....   | 22        |
| a) Les voies de signalisation qui activent mTORC1 .....  | 22        |
| b) Les facteurs d'activation de mTORC1 .....   | 23        |
| c) Les protéines effectrices de la voie mTORC1 .....   | 25        |
| <b>. PARTIE 2. Le rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique 27</b>     |           |
| 1. Structures impliquées dans l'intégration centrale des signaux .....                           | 27        |
| a) L'hypothalamus .....  | 27        |
| b) Le noyau arqué.....   | 28        |
| c) Les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique..... | 32        |
| 2. Les signaux périphériques intégrés au niveau hypothalamique.....                              | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| a) Les signaux anorexigènes .....  | 33        |
| (i) La leptine .....   | 33        |
| (ii) L'insuline.....   | 34        |
| (iii) Les nutriments .....   | 36        |
| b) Les signaux hormonaux orexigènes : exemple de la Ghréline .....                     | 39        |
| <b>. PARTIE 3. L'implication de mTORC1 et des ROS dans la régulation de la balance</b> |           |
| <b>énergétique.....</b>  | <b>40</b> |
| 1. Le rôle de la voie mTORC1 dans la régulation du métabolisme .....                   | 40        |
| a) Au niveau des tissus périphériques .....  | 41        |
| b) Au niveau central .....   | 41        |
| (i) mTORC1 au niveau de l'hypothalamus .....   | 41        |
| (ii) mTORC1 au niveau des neurones POMC .....  | 46        |
| 2. Le rôle des ROS dans le métabolisme .....   | 47        |
| a) Au niveau périphérique.....   | 47        |
| b) Au niveau central .....   | 48        |
| (i) Le rôle des ROS au niveau hypothalamique .....                                     | 48        |
| (ii) Rôle des ROS au niveau des neurones de l'ARC.....                                 | 50        |
| 3. Interactions connues entre mTORC1 et les ROS.....                                   | 55        |
| a) La voie mTORC1 régule la respiration mitochondriale.....                            | 55        |
| b) Les ROS sont également capables de moduler mTORC1 .....                             | 56        |
| <b>. POSITION DE LA PROBLEMATIQUE.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>. OBJECTIFS .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>. MATERIELS ET METHODES .....</b>   | <b>58</b> |
| 1. Modèle animal .....   | 59        |
| a) C57Bl6J.....  | 59        |
| b) S6K1 WT ou KO .....   | 59        |
| c) POMC-raptor-WT et -KO .....   | 59        |
| d) POMC Rosy.....  | 60        |
| 2. Neurochirurgie .....  | 61        |
| 3. Outils pharmacologiques .....   | 62        |
| a) Modulateurs de ROS.....   | 62        |
| (i) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 62        |
| (ii) Honokiol .....  | 62        |
| b) Modulateurs de mTORC1 .....   | 63        |
| (i) Leptine .....  | 63        |
| (ii) Rapamycine .....  | 63        |
| 4. Etudes du comportement alimentaire.....   | 64        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5. Analyse de l'expression des ROS dans les neurones POMC : mise au point d'une technique de quantification du signal des ROS au niveau des neurones anorexigènes POMC..... | 64        |
| a) Le dihydroéthidium (DHE).....  | 64        |
| b) Immunofluorescence POMC .....  | 65        |
| c) Capture et analyse des images.....   | 65        |
| 6. Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale hypothalamique .....  | 66        |
| 7. Quantification de protéines .....  | 68        |
| 8. Western blot .....   | 68        |
| 9. Immunohistochimie c-fos .....  | 69        |
| 10. Statistiques .....  | 70        |
| <b>. RESULTATS.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>I. Le rôle des ROS dans la régulation de la prise alimentaire au niveau central .....</b>  | <b>71</b> |
| 1. Effets de la modulation aiguë des ROS dans la régulation de la prise alimentaire .....   | 71        |
| a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 71        |
| b) Honokiol .....   | 72        |
| 2. Effets de l'administration aiguë d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ICV sur l'activation neuronale au niveau du noyau arqué.....  | 73        |
| 3. Effets de l'administration aiguë d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ICV sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC .....  | 75        |
| <b>II. Le rôle de la voie mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par les ROS .....</b>   | <b>79</b> |
| 1. Effets de l'administration aiguë d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ICV sur la phosphorylation de S6K1 au niveau hypothalamique .....                                       | 79        |
| 2. Effets de la modulation aiguë des ROS sur la prise alimentaire des S6K1 WT et KO .....   | 81        |
| a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 81        |
| b) Honokiol .....   | 82        |
| 3. Effets de l'administration combinée d'un inhibiteur de mTORC1 et d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la prise alimentaire.....   | 83        |
| 4. Effets de l'administration aiguë d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ICV des souris POMC-raptor-WT et -KO.....   | 85        |
| a) Sur la prise alimentaire et le poids corporel.....   | 85        |
| b) Sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.....  | 86        |
| <b>III. Le rôle des ROS et de la voie mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par la leptine.....</b>   | <b>88</b> |
| 1. Effets de l'administration ICV concomitante d'un piègeur de ROS (honokiol) et de la leptine (activateur de mTORC1) sur la prise alimentaire .....                        | 88        |
| 2. Effets de l'administration aiguë de leptine sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris C57Bl6J .....   | 90        |

|   |            |
|---|------------|
| 3. Effets de l'administration aigue de leptine sur la consommation hypothalamique en oxygène des souris C57Bl6J ..... | 92         |
| 4. Effets de l'administration aigue de leptine chez les souris POMC-raptor-WT et -KO .....                            | 94         |
| a) Sur la prise alimentaire et le poids corporel.....   | 94         |
| b) Sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.....  | 95         |
| <b>. DISCUSSION .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>118</b> |
| <b>. ANNEXES .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>. BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>147</b> |

## . **INTRODUCTION GENERALE**

### . **PARTIE 1. Le métabolisme des nutriments est source d'énergie intracellulaire**

L'homéostasie énergétique résulte de l'équilibre dynamique entre les différents composants de la balance énergétique: apports d'énergie fournis par l'alimentation et les processus consommateurs d'énergie comme le métabolisme de base, la thermorégulation induite par la prise alimentaire et l'activité physique. . En situation physiologique, de multiples mécanismes régulent de manière sophistiquée la prise alimentaire, le stockage et la mobilisation des réserves énergétiques en réponse aux besoins énergétiques et en nutriments de l'organisme.

#### **I. Les différentes sources d'énergie**

Les organismes vivants ont besoin d'énergie pour assurer le fonctionnement physiologique des organes, maintenir la température corporelle à 37°C, se mouvoir, se reproduire etc.... Chez les animaux, l'énergie provient du catabolisme des aliments, aboutissant à la synthèse d'ATP (adénosine 5' triphosphate). L'ATP est une molécule possédant deux liaisons riches en énergie. Il ne constitue pas une forme stockable d'énergie. La quantité totale d'ATP d'un individu est consommée en 2 à 3 minutes, ce qui implique un taux de renouvellement extrêmement important afin de maintenir un équilibre entre production et consommation d'énergie. Les cellules utilisent des voies cataboliques différentes et interconnectées pour transférer l'énergie provenant du catabolisme des nutriments à l'ATP (**Figure 1**).

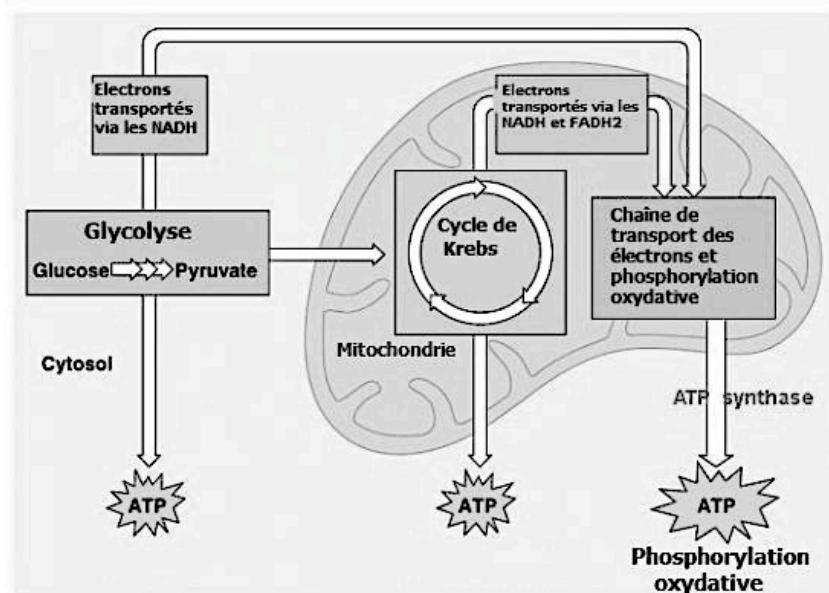


Figure 1. Les différentes sources intracellulaires d'ATP.

## 1. Le métabolisme des nutriments

### a) Le glucose

Le métabolisme du glucose aboutit à la synthèse d'ATP via 2 processus successifs : la glycolyse, puis la phosphorylation oxydative.

La **glycolyse** est une voie catabolique de transformation du glucose, sous forme d'hydrates de carbone partiellement catabolisés, en énergie. Elle comprend 10 réactions enzymatiques qui dégradent une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate sans consommation d'oxygène, au niveau du cytosol. Le gain net au cours de ces réactions est de 2 molécules d'ATP et de 2 NADH.

Le produit de la glycolyse, le pyruvate est converti par le cycle de Krebs en acétyl CoA en conditions aérobies et en lactate en conditions anaérobies. De manière générale, la glycolyse produit de l'énergie rapidement, mais de courte durée, par rapport aux autres voies génératrices d'ATP (cycle de Krebs, phosphorylation oxydative).

Lors de la glycolyse aérobie, une formation de lactates est possible comme par exemple dans les astrocytes (Welbert et al., Nature Reviews Neuroscience 2009).

En cas de glycémie basse (jeune prolongé), le cerveau est aussi capable d'utiliser les corps cétoniques, produits de la dégradation d'une partie de l'acétyl CoA au niveau hépatique, comme substrat énergétique (Morris et al., 2005).



## **b) Les lipides**

Les AG sont principalement synthétisés dans le foie. Ils dérivent des triglycérides, des lipoprotéines du sang ou des adipocytes. Ils sont stockés sous forme d'esters d'acides gras dans les adipocytes. Les AG sont transportés par la circulation sanguine en se liant à l'albumine avant d'être distribués au cœur, aux muscles squelettiques et au foie.

Le métabolisme des lipides permet également la synthèse d'ATP par la  $\beta$ -oxydation des acides gras (AG) qui aboutit à la synthèse d'acétyl CoA, qui est ensuite métabolisé par le cycle de Krebs, aboutissant finalement à la synthèse d'ATP.

L'oxydation des AG se fait au niveau de la mitochondrie ou des peroxysomes. C'est une source majeure d'ATP, de plus longue durée et plus importante que le glycogène, capitale pour l'homéostasie énergétique de la cellule, notamment en période de jeûne.

## **c) Les acides aminés**

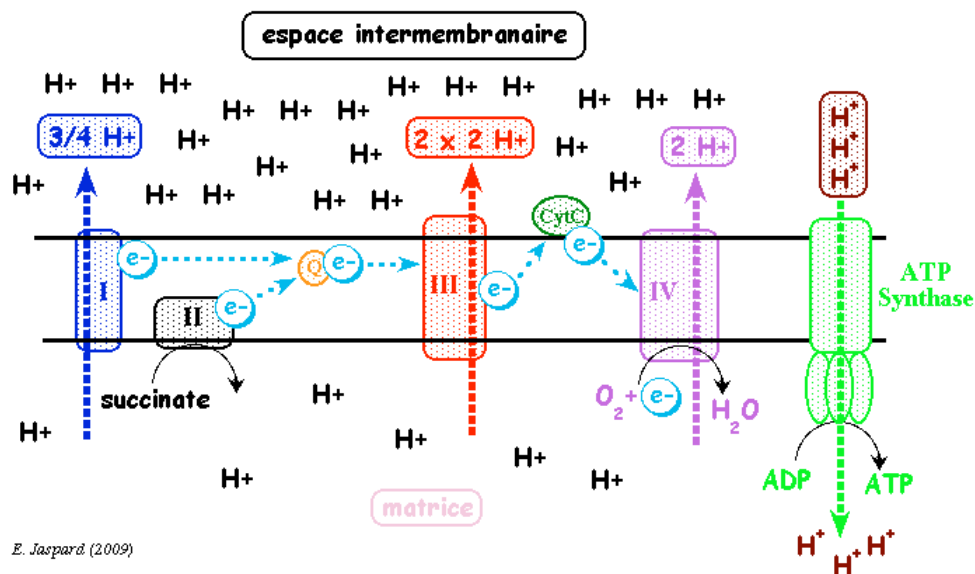
Le métabolisme des acides aminés chez les animaux permet de maintenir la réserve des acides aminés et d'assurer le renouvellement des protéines. Contrairement aux glucides et lipides, les acides aminés en excès ne peuvent être stockés. Ils sont alors rapidement dégradés par transamination ou par oxydation au niveau hépatique pour donner un ion ammonium et un squelette carboné qui peuvent servir de précurseurs à la synthèse des glucides ou être convertis en acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras.

Le **cycle de Krebs** est une voie métabolique produisant à partir de l'acétyl-CoA des intermédiaires énergétiques conduisant à la production d'ATP à travers la chaîne respiratoire mitochondriale en aérobose. Il est le point final du catabolisme des glucides (glycolyse, voie des pentoses phosphates), des lipides ( $\beta$ -oxydation) et des acides aminés. Le cycle de Krebs aboutit à la formation d'1 ATP ou GTP et génère du NADH ou du FADH<sub>2</sub>, utilisés lors de la phosphorylation oxydative pour former de grandes quantités d'ATP.

## **2. La phosphorylation oxydative**

Avec le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative est le processus ultime de dégradation des différents métabolites en dioxyde de carbone et en eau. La phosphorylation oxydative utilise l'énergie libérée par l'oxydation des nutriments pour produire de d'ATP. Elle se situe

au niveau de la mitochondrie, La membrane interne mitochondriale héberge les 4 complexes de la chaîne de transport des électrons ainsi que l'ATP synthase. (**Figure 2**)



**Figure 2. La phosphorylation oxydative** a lieu au niveau de la mitochondrie. Elle comprend la consommation de l'oxygène (respiration mitochondriale) qui est un accepteur terminal d'électrons et de protons et la phosphorylation de l'ADP en ATP qui contient une accumulation d'énergie chimique. Elle implique les complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que l'ATP synthase.

### Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM)

#### ❖ Le complexe I de la CRM : la NADH-Ubiquinone oxydoréductase

Le transfert initial d'électrons nécessite le cofacteur équivalent réduit NADH. Ce dernier est oxydé sur la face matricielle de la membrane par la NADH-deshydrogénase. Le complexe I catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à l'expulsion de protons de la matrice à l'espace intermembranaire.

#### ❖ Le complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate, qui permet le transfert de 2 électrons au complexe b-c1 (complexe III) par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH<sub>2</sub> et d'un pool d'ubiquinone. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à l'efflux de protons.

#### ❖ Le complexe III de la CRM : Complexe b-c1 (ubiquinol-cytochrome C réductase)

Les ubiquinones sont des transporteurs libres d'électrons du complexe I et II vers le complexe III. Le complexe III permet un transfert d'électrons à un 2<sup>ème</sup> transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c, qui le relie au dernier complexe de la chaîne

respiratoire. Ce transfert d'électrons de l'ubiquinone au cytochrome c est un processus associé à un efflux de protons.

#### ❖ **Le complexe IV : cytochrome c oxydase**

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O par 4 électrons. Le transfert des électrons est irréversible contrairement à celui ayant lieu au complexes I et III. Ce transfert d'électrons est associé à un efflux de protons vers l'espace intermembranaire.

#### ❖ **L'ATP synthase : FOF1-ATP synthase (complexe V)**

L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi et permet donc de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique.

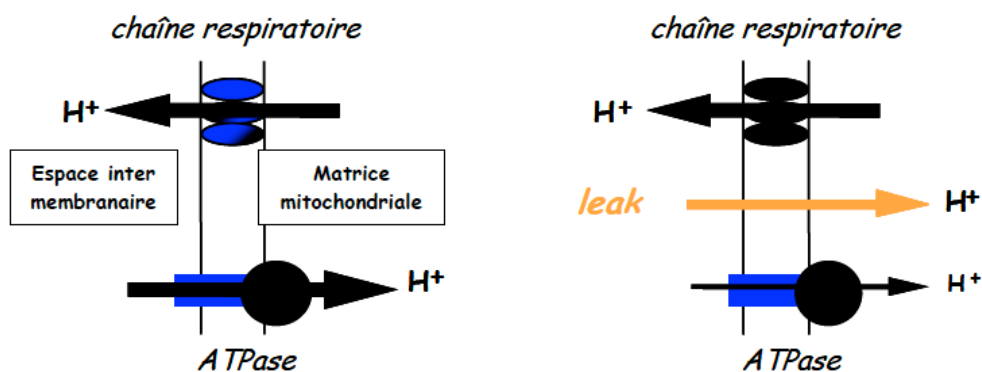
La chaîne respiratoire oxyde des équivalents réduits provenant des substrats alimentaires, en transférant leurs électrons sur un accepteur final qui est l'oxygène, transfert qui s'accompagne d'une expulsion des protons en dehors de la matrice mitochondriale, vers l'espace intermembranaire. Le gradient électrochimique ainsi formé constitue la force proton-motrice qui permet aux protons de rentrer dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase. Les protons en rentrant cèdent au passage leur énergie, autorisant ainsi la synthèse d'ATP. Il existe un couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP.

L'ATP ainsi synthétisé est ensuite exporté vers le cytosol en échange d'ADP tout en consommant une partie du potentiel de membrane. La force proton-motrice permet également le transfert actif d'ions et de métabolites contre leur gradient de concentration (ion phosphate, calcium, pyruvate). La phosphorylation oxydative est une fonction vitale du métabolisme. Elle génère de manière physiologique des dérivés réactifs de l'oxygène.

#### **Le découplage de la chaîne respiratoire (Figure 3)**

Une proportion significative (20%) de la respiration mitochondriale (Brand, 2000) n'est pas couplée à la synthèse d'ATP. Dans ce cas, on parle de **découplage de la phosphorylation oxydative**. L'imperméabilité de la membrane n'est jamais absolue. Une partie du gradient de protons est dissipée par retour passif des protons, sans passer par l'ATP synthase, entraînant une libération/dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Enerbäck et al., 1997). Les protéines UCP (Uncoupling protein), responsables de la fuite de protons et du découplage,

agissent comme un transporteur mitochondrial et participent à la régulation du métabolisme mitochondrial. L'UCP1 est principalement exprimée au niveau du tissu adipeux brun, l'UCP2 au niveau du tissu adipeux, du muscle, de l'hypothalamus et de nombreux autres tissus et l'UCP3 au niveau du muscle squelettique et myocardique. Ce découplage provoque une diminution de la synthèse d'ATP pour une consommation d'oxygène identique, induisant ainsi une diminution du rendement de la phosphorylation oxydative et de la production de ROS.



**Figure 3. Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

La fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale entraîne une diminution de la force proton-motrice, moteur de l'ATP synthase, ce qui se traduit par une chute de la synthèse d'ATP et une augmentation de la vitesse de respiration (Luvisetto et al., 1987)

## II. La production physiologique des ROS résulte du métabolisme des nutriments

### 1. Généralités.

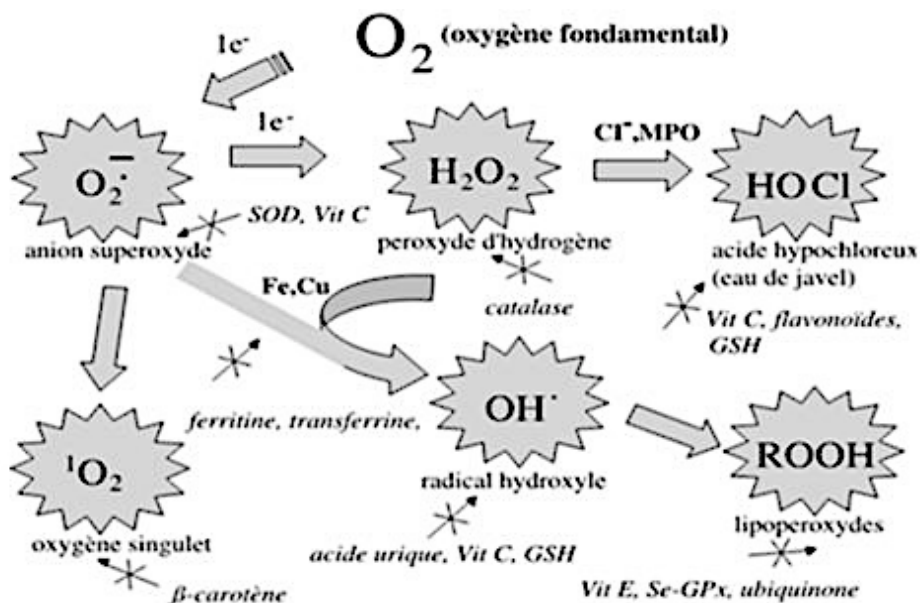
Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) sont des espèces chimiques oxygénées, produits du métabolisme physiologique de l'oxygène et pouvant oxyder d'autres molécules. Elles comprennent l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux peroxy ( $RCOO^{\circ}$  et  $OH^{\circ}$ ). (**Figure 4**)

Lors de la phosphorylation oxydative, une part de l'oxygène consommé (autour de 1%) échappe à la réduction complète en molécule d'eau et subit une réduction mono électronique au niveau des complexes I et III (Rolfe and Brown, 1997). Le passage d'un électron sur la molécule d' $O_2$  forme un  $O_2^{\circ-}$  qui est rapidement transformé en  $H_2O_2$  et  $O_2$ .

## Les différentes ROS :

- **L'anion superoxyde**  $O_2^{\bullet -}$  est un monoanion radical avec un électron célibataire. Il est plus instable et plus réactif que la molécule d'oxygène. Sa demi vie est courte (de l'ordre de la microseconde) et il est le précurseur d'autres formes de ROS comme le peroxyde d'hydrogène.
- **L'anion peroxyde**  $O_2^{2-}$  n'est pas un radical. Il est très instable du fait de la présence d'un 4<sup>e</sup> électron. Dans l'eau, l'anion peroxyde  $O_2^{2-}$  se transforme en peroxyde d'hydrogène par acceptation de 2 protons.
- **Le peroxyde d'hydrogène** ( $H_2O_2$ ) n'est pas un radical libre et il est plus stable que le  $O_2^{\bullet -}$  (demi-vie de l'ordre de la minute). Il joue un rôle très important dans les réactions radicalaires car il peut donner des radicaux hydroxyle par réduction mono électronique.
- **Le radical hydroxyle**  $HO^\bullet$  est un puissant oxydant avec une durée de vie très faible (demi-vie de l'ordre de la nanoseconde) hautement toxique car il réagit avec les acides nucléiques, les AG et les glucides.

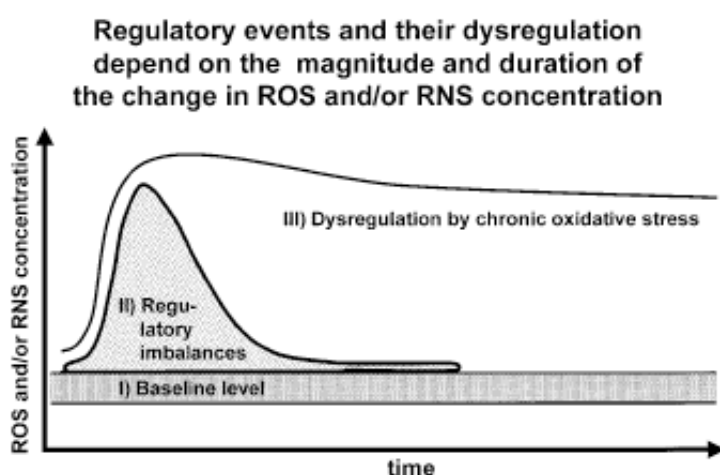
**Les radicaux alkyles R<sup>•</sup> et peroxydes ROO<sup>•</sup>** sont issus de l'oxydation des AG polyinsaturés et sont impliqués dans la peroxydation lipidique (Slater, 1982).



**Figure 4.** Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) comprennent notamment l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux peroxydes ( $OH^\bullet$ ). Les enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion-peroxydase permettent de réguler les ROS.

Les ROS endogènes ont une utilité physiologique au sein des cellules. Ils régulent l'autophagie, l'immunité, la différenciation, l'apoptose, la survie et la prolifération cellulaire l'adaptation à l'hypoxie et la réponse à un stress cellulaire de manière générale (Sena and Chandel, 2012). Les ROS, en particulier l' $H_2O_2$ , peuvent exercer le rôle de second messager dans certaines cascades de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire (JNK, ERK, MAPK, NFkB, PKC). Ces voies impliquent des protéines kinases, des phosphatases et des facteurs de transcription (Dröge, 2002a) (Sauer et al., 2001). Les mécanismes moléculaires exacts de ces effets sont mal connus et pourraient être liés à des variations intracellulaires de Calcium (Görlach et al., 2015). Ils dépendent d'une régulation très fine entre la production de ROS et les systèmes antioxydants.

Dans certaines conditions, un état de déséquilibre entre la production des ROS et les systèmes anti-oxydants de l'organisme apparaît. Lorsque ce déséquilibre persiste dans le temps et lorsque les enzymes antioxydantes n'arrivent plus à contrôler l'accumulation intracellulaire de ROS, ce phénomène affecte le fonctionnement normal de la cellule, constituant le stress oxydant. Celui ci est responsable de toxicité cellulaire et est impliqué dans de nombreuses maladies (cancer, athérosclérose, diabète, Alzheimer entre autres) (Sabharwal and Schumacker, 2014) (Dumont and Beal, 2011) (**Figure 5**). Il peut résulter d'un excès de ROS et/ou d'une insuffisance de défenses anti-oxydantes.



**Figure 5. L'homéostasie redox** (Dröge, 2002a).

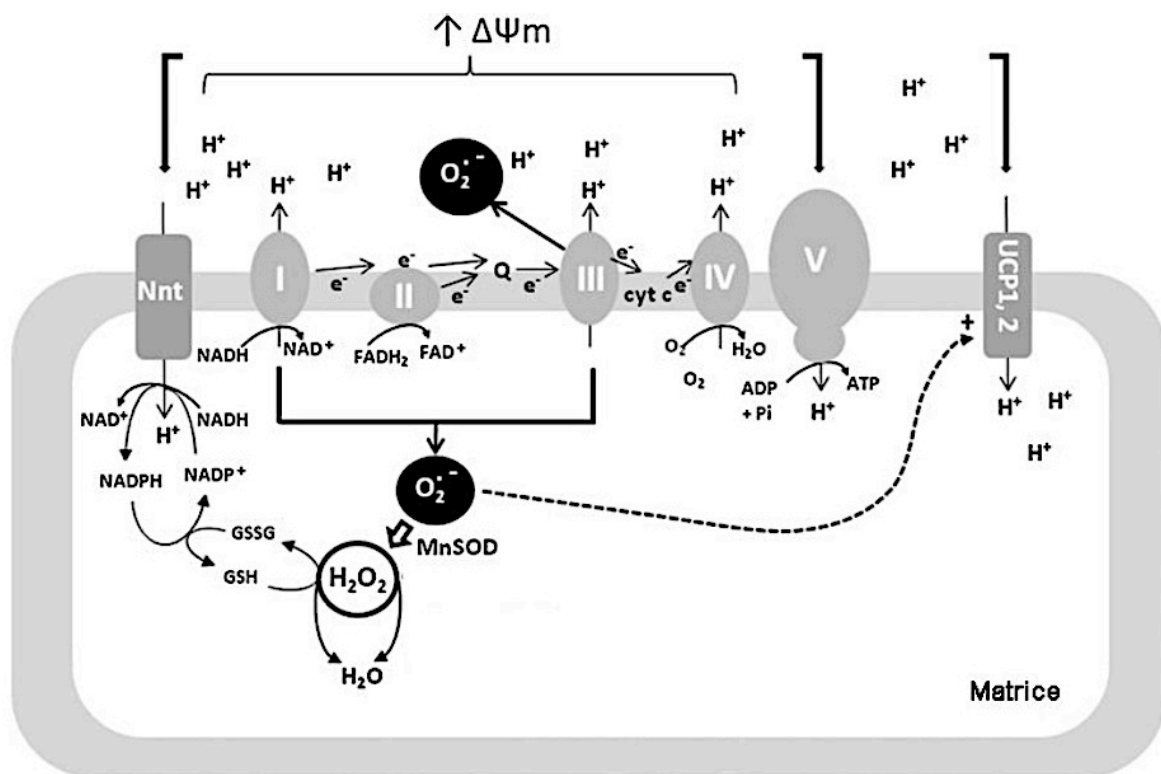
Une production contrôlée, modérée et brève de ROS exerce des effets positifs sur l'organisme et permet de maintenir l'homéostasie redox.

En cas de production intense et durable et/ou si les systèmes anti-oxydants ne peuvent plus contrôler les niveaux de ROS intracellulaires, un état de stress oxydant se produit, responsable de toxicité cellulaire.

### a) Sources mitochondriales de ROS

Le transit d'électrons dans la CRM, en particulier le complexe I et III ((Kussmaul and Hirst, 2006) (Liu et al., 2002) est la source d'une production mitochondriale de ROS (ROS mitochondriaux ou ROSm), corrélée aux entrées de substrats dans la mitochondrie (Rolfe and Brown, 1997) (St-Pierre et al., 2002). (**Figure 6**)

Les mécanismes exacts de production des ROSm au niveau des complexe I (Kussmaul Hirst 2006 cachexie ; Hinkle 1967 ; Liu 2002 th cachexie), du complexe II (Brand, 2000) et du complexe III (St-Pierre et al., 2002) (Liu et al., 2002) ne sont pas clairement reconnus.



**Figure 6. Production mitochondriale des ROS.**

La fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne une réaction avec l'O<sub>2</sub> moléculaire, ce qui conduit à la formation de l'anion superoxyde, qui sera ensuite transformé en radicaux moins réactifs comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les systèmes anti-oxydants

## **b) Sources non mitochondriales de ROS**

- ❖ Le **peroxysome** joue un rôle important dans la production intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et contient de nombreuses enzymes générant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de permettre les réactions de peroxydation d'autres substrats.
- ❖ Le **réticulum endoplasmique lisse** contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. Notamment le cytochrome P450 oxyde les acides gras insaturés, produisant ainsi des ROS et en particulier des anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.
- ❖ **Au niveau de la membrane plasmique**, la NADPH oxydase catalyse la réduction mono électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons, ce qui entraîne la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NADP<sup>+</sup>. Cette réaction est particulièrement impliquée dans les réactions immunitaires (Piotrowski and Marczak, 2000).

## **2. Les voies de signalisation activées par les ROS**

L'équilibre entre les systèmes producteurs de ROS et les systèmes anti-oxydants correspond à l'homéostasie redox. Une augmentation physiologique aigue et transitoire de la production de ROS entraîne une signalisation intracellulaire qui modifie les cibles environnantes de manière réversible. Les ROS agissent alors comme des molécules « signal » constituant la **signalisation dite « redox »**.

La signalisation par les ROS est le plus souvent médiée par des protéines qui possèdent des cystéines dont les groupements thiol (donneur d'électrons) sont situés dans les sites actifs. Ces groupements thiols peuvent être directement oxydés par les ROS ou par des modifications du potentiel redox d'un couple prépondérant comme celui du glutathion. Les ROS peuvent ainsi modifier de manière rapide et réversible l'activité de différentes protéines kinases ou phosphatases (Chiarugi and Cirri, 2003), en agissant sur des résidus tyrosine (Allen and Tresini, 2000) ou cystéine (Denu and Tanner, 1998).

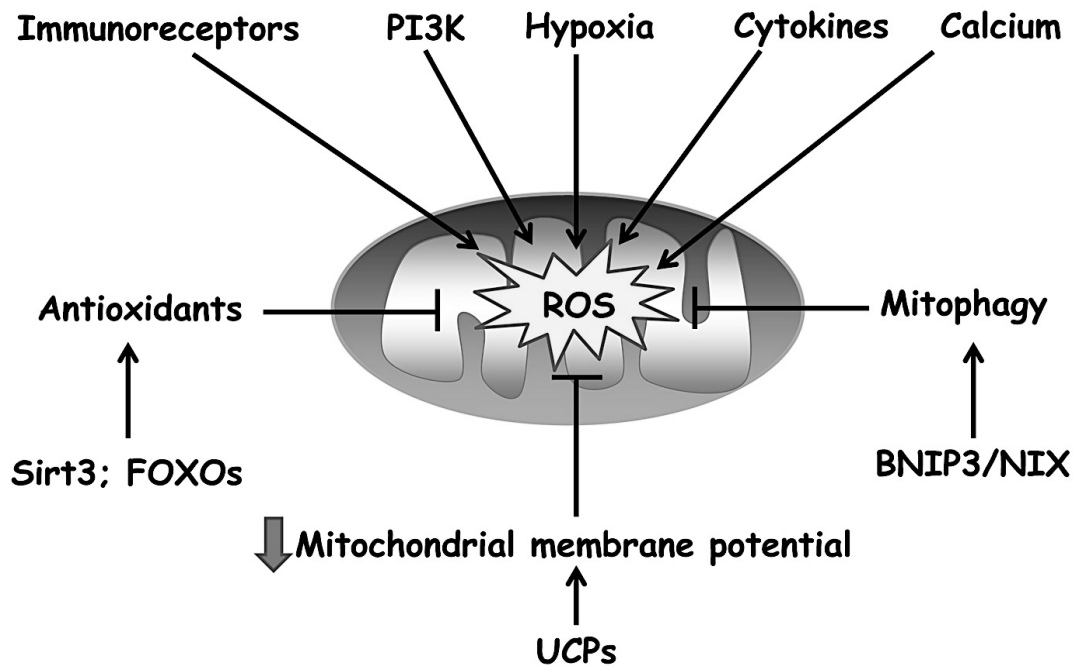


Parmi les nombreuses protéines potentiellement activées par les ROS, on retient principalement :

- **Les phosphatases PTEN** (phosphatase and tensin homolog), les **Cdc25** (cyclin-dependent kinases) et les **PTP1B** (protein tyrosine phosphatase 1B) (Cho et al., 2004).
- **Les MAPK** (Mitogen-activated protein kinases DEF ?) (Tonks, 2005) avec **ERK1/2**, **JNK** et **p38MAPK** (Lo et al., 1996).
- **Le facteur HIF** en cas d'hypoxie (Bell et al., 2007)b et en dehors de l'hypoxie (Patten et al., 2010).
- **Le récepteur à l'insuline** (Dröge, 2002b) : La signalisation induite par l'insuline sur son récepteur transmembranaire nécessite l'autophosphorylation de la kinase récepteur à l'insuline sur certains sites tyrosine (Tyr 1158 ; Tyr 1162 et Tyr 1163). L'insuline pourrait induire la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (selon un mécanisme impliquant la NADPHoxydase) qui serait alors capable d'inhiber les tyrosine-phosphatases, permettant l'activité de la kinase IR. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se lierait également à certains résidus cystéine du domaine kinase de l'IR, favorisant son activité.
- **Les facteurs de transcription NFκB** (nuclear factor-kappa B) et **AP1** (activator protein 1) impliqués dans la réponse au stress et la réponse immunitaire (Gloire et al., 2006).

### 3. La régulation des concentrations intracellulaires des ROS

Les organismes vivants possèdent des systèmes de défense et de régulation physiologiques de la concentration intra-cellulaire des ROS. L'enjeu cellulaire est de maintenir l'équilibre entre une production nécessaire et une production excessive toxique de ROS (stress oxydant). Cet équilibre repose sur l'activité des enzymes anti-oxydantes, sur la régulation de la phosphorylation oxydative et sur les voies de signalisation cellulaire situées en amont de la formation des ROS. (**Figure 4 et 7**)



**Figure 7. La régulation de la production des ROSm.** (Sena and Chandel, 2012)

La production et le métabolisme des ROS mitochondriaux sont régulés par différents facteurs. Les cytokines, l'hypoxie, une augmentation de la concentration cytosolique en calcium et l'activation de la voie PI3K favorisent une augmentation des ROSm.

L'expression de protéines anti-oxydantes comme FOXO ou Sirt3 (Sirtuin 3), la mitophagie et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, inductible par les protéines UCPs entraînent une diminution des ROS intracellulaires.

#### **a) La régulation de la production mitochondriale des ROS**

##### **❖ Voies de signalisation intracellulaire favorisant la production endogène des ROS**

L'activation des immunorécepteurs, des cytokines, de l'insuline, l'hypoxie, l'augmentation des concentrations cytosoliques en Calcium et l'activation de la voie PI3K augmentent la production des ROSm (Krieger-Brauer et al., 1997) (May and de Haën, 1979).

##### **❖ Voies de signalisation intracellulaire inhibant la production endogène des ROS**

Les facteurs de transcription FOXO (class O of Forkhead box transcription factors) jouent un rôle important dans le métabolisme, la prolifération cellulaire, la résistance au stress, l'apoptose et la régulation de la production mitochondriale de ROS. Dans des conditions physiologiques, FOXO1 induit l'expression de gènes anti-oxydants comme le gène de la catalase pour diminuer l'apoptose. En cas de stress oxydant, au contraire, FOXO1 favorise la mort cellulaire (Ambrogini et al., 2010). Les récepteurs nucléaires PPAR (peroxisome-proliferator activator receptor) sont également capables de diminuer les concentrations intracellulaires de ROS, notamment en activant l'expression de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes ou pour l'UCP2 (Aleshin and Reiser, 2013).

### ❖ **Modulation mitochondriale des ROS**

Le facteur de biogénèse mitochondriale PGC1 $\alpha$  (peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) augmente la quantité de mitochondries, mais stimule également l'expression des enzymes anti-oxydantes afin de maintenir la balance redox (St-Pierre et al., 2006). La quantité de mitochondries n'est donc pas toujours corrélée avec la quantité de ROSm (Sena and Chandel, 2012). Néanmoins, la mitophagie (dégradation des mitochondries par autophagie) est un processus intracellulaire qui peut permettre de diminuer la production des ROSm (Kurihara et al., 2012). Ces mécanismes mitochondriaux sont encore mal connus et les données de la littérature sont parfois discordantes.

### **b) La régulation de la phosphorylation oxydative**

#### **(i) Par la consommation d'ATP (intensité respiration)**

L'ATP ne peut être stocké. La mitochondrie s'adapte donc en permanence à la demande énergétique cellulaire via une régulation rapide de la phosphorylation oxydative (Kadenbach et al., 2010). La mitochondrie peut moduler la production mitochondriale d'ATP et de ROSm, en régulant la vitesse (intensité de respiration) et l'efficacité (intensité du couplage entre la respiration et la phosphorylation) de la respiration mitochondriale en fonction des besoins énergétiques de la cellule.

- Si la consommation d'ATP augmente, le transport d'ATP vers le cytosol augmente et induit une augmentation du transport d'ADP vers la matrice mitochondriale. L'ADP stimule l'activité de l'ATP synthase et favorise donc à la respiration mitochondriale et la production de ROSm.
- Si l'ATP n'est pas consommé, l'activité de l'ATP synthase diminue, ce qui inhibe l'activité de la CRM et la donc la formation des ROSm (Kadenbach, 2003).

#### **(ii) Par le découplage de la phosphorylation oxydative (protéines UCP)**

Le découplage de la phosphorylation oxydative entraîne une diminution de son efficacité et de l'activité de l'ATP synthase (reflétée par la quantité d'ATP synthétisée) ce qui permet de réguler la production des ROS. Les niveaux d'expression de l'ARNm des protéines UCP varient selon la température extérieure (froid) et interne (fièvre), l'état nutritionnel (jeûne, obésité), l'activité physique et les nutriments (lipides). Une augmentation de l'expression des

protéines UCPs favorise le découplage de la respiration mitochondriale, diminue le potentiel de membrane mitochondrial et diminue la formation des ROSm. La protéine UCP2 est particulièrement exprimée au niveau cérébral et notamment au niveau hypothalamique (Shadel and Horvath, 2015). Les acides gras peuvent augmenter l'expression d'UCP2 en activant les récepteurs PPARs (Oberkofler et al., 2006), ce qui entraîne une diminution de la production de ROSm (Duval et al., 2002). Le facteur PGC1 $\alpha$  favorise également l'expression d'UCP2 (Toda and Diano, 2014).

### (iii) Par les ROS (rétrocontrôle)

Les mécanismes impliqués dans le découplage pourraient aussi être modulés par une action directe des ROS. L'exposition de mitochondries aux ROS induirait une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Tonkonogi et al., 2000) qui pourrait être liée à une augmentation de la perméabilité membranaires aux protons induite par l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Echtay et al., 2002).

Les ROS sont également capables d'activer UCP2, ce qui entraîne une diminution de la production de ROSm (Toda and Diano, 2014) (Echtay et al., 2002). En cas d'excès de ROS, ce mécanisme constitue un système de rétrocontrôle négatif des ROS sur leur propre production.

Une augmentation de la concentration intracellulaire des ROS induit également l'expression de nombreux gènes dont ceux codant pour les **défenses anti-oxydantes**, comme la catalase, la SOD 2 (Shull et al., 1991) ou encore la thiorédoxine réductase. Cette augmentation de l'expression des systèmes antioxydants par les ROS constitue un rétrocontrôle négatif.

## c) Les systèmes anti-oxydants par détoxification directe des ROS

### (i) Les enzymes anti-oxydantes

- **L'activité superoxyde dismutase (SOD)** assure la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>. Il existe 3 isoformes de SOD : une forme cytosolique et nucléaire; une forme mitochondriale et une forme extracellulaire.

L'action des SOD est couplée à celle des enzymes qui décomposent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (catalase et glutathion peroxydases).

- **La catalase (CAT)** est une enzyme qui décompose l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène. Elle est localisée principalement dans le peroxysome et aussi dans le cytoplasme.

- **La glutathion peroxydase (GPx)** décompose l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les hydroperoxydes/lipides peroxydés. La GPx nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule.

## **(ii) Les piègeurs de ROS**

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques de la cellule sont le plus souvent soit lipophiles (vitamine E, coenzyme Q ou ubiquinone), soit hydrophiles (vitamine C, glutathion). Ils réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent.

Une régulation fine de l'équilibre entre la production de ROS et les systèmes antioxydants est nécessaire au fonctionnement physiologique de l'organisme. En cas de dérégulation intense ou prolongée de ce système redox, les ROS peuvent s'accumuler dans les cellules et entraîner un dysfonctionnement pathologique responsable de stress oxydant. **(Figure 4)**

## **III. L'implication de la voie mTORC1 dans le métabolisme physiologique des nutriments**

### **1. Généralités**

La protéine mTOR est une enzyme intracellulaire de 289 kDa à activité sérine-thréonine kinase. Cette enzyme, mise en évidence en 1991 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, possède une structure hautement conservée avec 95% d'homologie de séquence entre la souris, le rat et l'homme. Chez la souris, l'inactivation du gène TOR est létale au stade embryonnaire.

La partie N-terminale de la protéine mTOR contient 20 domaines HEAT (Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR1) impliqués dans les interactions protéine-protéine (Andrade et Bork 1995 thèse x). La partie C-terminale contient le domaine catalytique de mTOR. Celui-ci contient différents sites de phosphorylation qui sont les cibles de kinases localisées en amont comme AMPK (régulateur négatif) ou Akt (régulateur positif) ou en aval comme la protéine S6K (Martínez de Morentin et al., 2014) (Laplanche and Sabatini, 2012a). L'activité kinase de

mTOR est inhibée spécifiquement par la rapamycine, une lactone macrocyclique, produite par la bactérie *Streptomyces hydropiscus*. La rapamycine se lie à mTOR au niveau du domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) (Hay and Sonenberg, 2004), à proximité du domaine catalytique. (**Figure 8**)

Chez l'homme, la protéine mTOR s'exprime sous la forme de 2 complexes multiprotéiques, mTORC1 et mTORC2, ayant des structures, des modes de régulation, des fonctions et une sensibilité différente à la rapamycine (Bhaskar and Hay, 2007).

- **Le complexe mTORC1**, est constitué de plusieurs protéines : mTOR, mLST8/GbL (mammalian lethal with Sec13 protein 8), PRAS40 (prolin-rich Akt/PKB substrate 40 kD), deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein) et Raptor.
- **Le complexe mTORC2** comprend la protéine Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), mSin1 (mammanlian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1), deptor and Protor-1 and 2 (protein observed with Rictor 1 and 2).

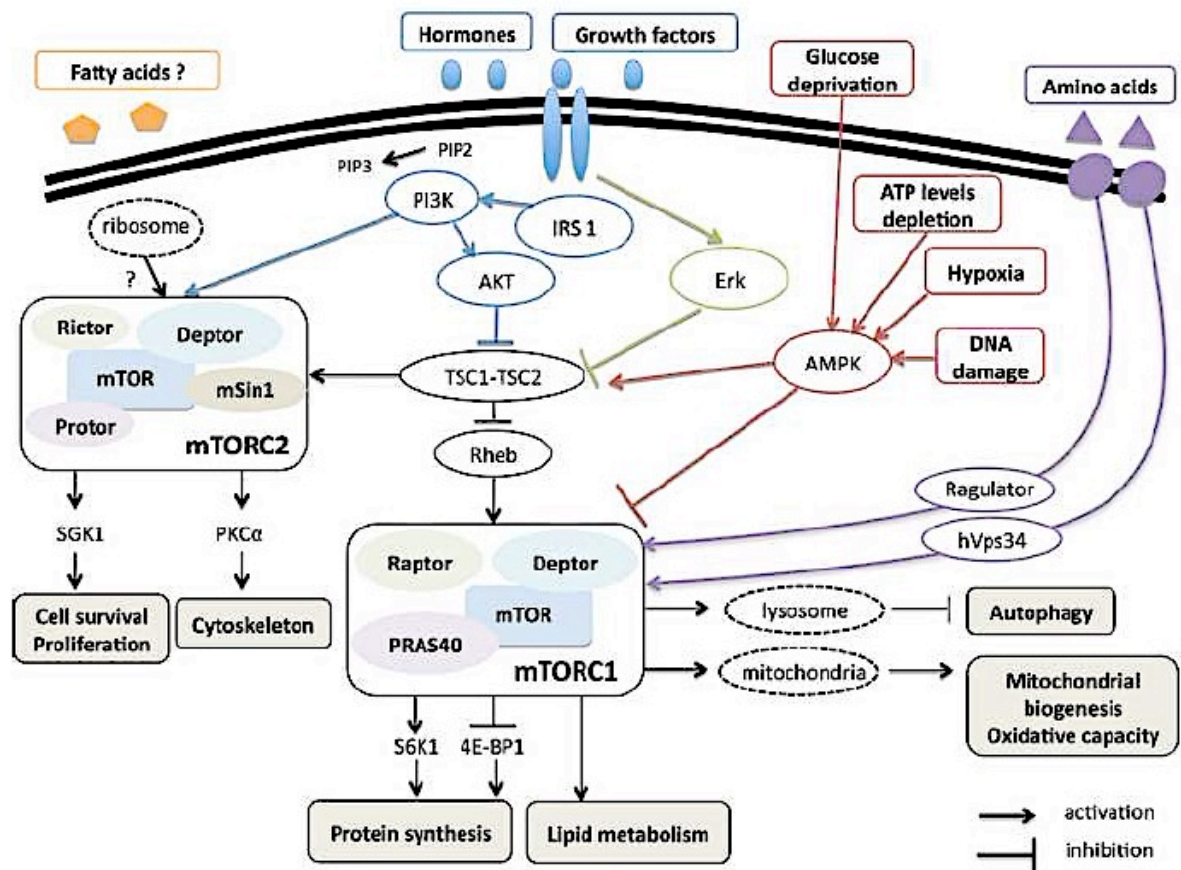
L'invalidation génétique des différents composants de mTORC1 et mTORC2 ont permis de différencier la part de ces 2 complexes dans le développement embryonnaire et l'importance fonctionnelle des différents composants de ces complexes. Classiquement, mTORC1 est décrit comme sensible à la rapamycine tandis que mTORC2 est le plus souvent insensible à la rapamycine. La rapamycine inhibe l'activité de mTOR en formant un complexe avec la protéine FKBP12, ce qui entraîne une réduction de l'activité catalytique de la kinase (Choi et al., 1996). Certaines études ont néanmoins montré que dans certaines conditions (exposition prolongée à la rapamycine) et dans certaines cellules, la rapamycine est capable d'inhiber aussi mTORC2 (Sarbasov et al., 2006).

**Raptor** est une protéine de 150 kDa avec 7 domaines WD répétés, et dont le rôle est de recruter les substrats de mTOR (Hara et al., 2002) et de stabiliser le complexe mTORC1 (Bhaskar and Hay, 2007). Dans des conditions de privation en nutriments (milieu pauvre en acides aminés ou en glucose), Raptor se lie avec une haute affinité à mTOR, ce qui le maintient dans une conformation inactive, tandis qu'en milieu riche en nutriments (leucine ou glucose), cette interaction est moins forte, permettant ainsi à mTOR de phosphoryler ses cibles (Kim et al., 2002). La protéine Raptor n'a pas d'activité catalytique propre, mais son intégrité est indispensable pour la fonction du complexe mTORC1 (Guertin et al., 2006).

**PRAS40 et Deptor** régulent la capacité de mTORC1 à phosphoryler les cibles en amont de la liaison à Raptor (Oshiro et al., 2007) et sont des régulateurs négatifs de mTORC1 (Peterson et

al., 2009). L'activation de mTOR induit la phosphorylation de ces 2 protéines ce qui inhibe leur association avec mTOR et permet l'activation de mTORC1 (Wang et al., 2007).

**mLST8/GbL** est une protéine qui interagit directement avec mTOR et augmente son activité kinase. Sa délétion n'affecte pas l'activité de mTORC1 de manière significative (Guertin et al., 2006).



**Figure 8.** La voie de signalisation mTORC1 est activée par les nutriments, les hormones et les facteurs de croissance par le biais de la voie PI3K/Akt ou de la voie des MAPK. L'activation de mTORC1 nécessite l'inhibition de TSC1/TSC2.

L'AMPK inhibe mTORC1 dans des conditions de déficit en énergie.

Les protéines S6K1 et 4<sup>E</sup>-BP1 sont les principales protéines effectrices de mTORC1.

L'activation de la voie mTORC1 régule la survie cellulaire, la prolifération, la synthèse protéique, le métabolisme des lipides, l'autophagie et la biosynthèse mitochondriale.

(Haissaguerre et al., 2014)

## 2. La voie de signalisation intracellulaire mTORC1

La voie mTORC1 régule la synthèse de protéines en coordonnant les facteurs de croissance, la disponibilité des nutriments et le statut énergétique intracellulaire. Elle inhibe également l'autophagie, un processus d'auto-dégradation qui permet de fournir des substrats énergétiques en cas de déficit énergétique (Zoncu et al., 2011).

### a) Les voies de signalisation qui activent mTORC1

mTORC1 appartient à la voie PI3K/AKT/mTOR qui est activée par le biais d'un récepteur membranaire à tyrosine-kinase et provoque à son tour l'activation d'une cascade de phosphorylations de différentes protéines intracellulaires (Laplane and Sabatini, 2012a). (Figure 8)

**PI3K** est un hétérodimère à activité kinase constitué d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Elle peut être activée directement par un récepteur à tyrosine-kinase ou par l'intermédiaire de la protéine Ras. PI3K peut être inhibée par PTEN.

PI3K forme un composé lipidique membranaire qui recrute la sérine thréonine kinase Akt à proximité de la membrane plasmique où elle est phosphorylée et activée par la PDK1 (phosphatidylinositol 3 dependent kinase 1) (Alessi et al., 1996) sous le contrôle de mTORC2 (Sarbasov et al., 2005).

**La protéine Akt ou protéine kinase B (PKB)** existe sous plusieurs formes (famille de kinases comprenant Akt 1, Akt 2 et Akt3). Elle contient un domaine PH qui permet d'interagir avec PI3K et de s'accrocher à la membrane et un domaine catalytique qui permet d'activer mTOR en inhibant par phosphorylation son régulateur négatif TSC (Wullschleger et al., 2006).

Le **complexe TSC** (tuberous sclerosis complex) composé de TSC1 et TSC2 (Cheadle et al., 2000) inhibe mTOR en agissant sur une protéine intermédiaire Rheb qui est l'activateur direct de mTOR dans cette cascade de signalisation intracellulaire.

La protéine **Rheb** (Ras homolog enriched in brain) est une GTPase en aval qui active mTORC1 en cas de liaison au GTP. Elle est régulée par l'activité GAP (GTPase-activating protein) de **TSC2**, qui est stabilisé par **TSC1** (Huang and Manning, 2008). La phosphorylation du complexe TSC1/TSC2 inhibe l'activité GAP et permet l'activation de Rheb et donc de mTORC1.

L'**AMPK**, un hétérotrimère composé d'une sous unité catalytique  $\alpha$  et de 2 sous unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ , constitue un régulateur négatif bien connu de mTORC1, soit par le biais de



l'activation de TSC2 (Inoki et al., 2003), soit par phosphorylation directe d'un site de mTOR (Cheng and Russell, 2004). L'AMPK est également capable de diminuer la phosphorylation de S6K1 (Kimura et al., 2003).

L'AMPK régule la balance énergétique au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme en répondant aux signaux hormonaux et nutritionnels au niveau central et périphérique (Kahn et al., 2005). L'AMPK est exprimé dans la majorité des tissus et est particulièrement impliqué dans l'homéostasie glucidique (Rutter et al., 2003). L'AMPK est activée dans les situations de déplétion énergétique cellulaire (diminution du ratio AMP/ATP), notamment en cas de diminution du taux d'ATP (Kemp et al., 1999), de déplétion en glucose (Viollet et al., 2003), en cas d'hypoxie ou de stress oxydant. Au niveau hypothalamique, l'activation de l'AMPK favorise la prise alimentaire (Minokoshi et al., 2004).

Les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines peuvent également activer mTORC1 en recrutant la kinase **ERK** (extracellular-signal-regulated kinase) et donc la voie des **MAPK** (Mitogen-activated protein kinases) qui peut inactiver par phosphorylation le complexe TSC1/TSC2 et ainsi activer mTORC1 (Ma et al., 2005).

La voie **Wnt** est une voie de signalisation qui est formée de glycoprotéines qui peuvent activer la voie mTORC1 en inhibant la glycogène synthase kinase 3 (Inoki et al., 2006) qui inhibe mTORC1 en activant TSC2.

## **b) Les facteurs d'activation de mTORC1**

Le rôle de la voie mTORC1 est d'intégrer les signaux énergétiques véhiculés par les facteurs de croissance, l'ATP, l'oxygène et les nutriments afin de répondre de manière adaptée aux besoins de l'organisme en modulant notamment le métabolisme, la croissance et la différenciation cellulaire (Laplanche and Sabatini, 2009) par un mécanisme impliquant notamment la synthèse de protéines et de lipides.

- **Les facteurs de croissance** stimulent mTORC1 par l'activation de la voie PI3K qui augmente la phosphorylation de TSC2 par Akt (Inoki et al., 2002). Ils peuvent également activer la voie mTORC1 en recrutant d'autres voies de signalisation telles que ERK et Wnt (Inoki et al., 2006) (Ma et al., 2005).
- **L'insuline** se lie à son récepteur ce qui entraîne l'activation de PI3K et Akt, qui inhibent TSC2 (Inoki et al., 2002) et entraîne l'activation de mTORC1.

- L'insuline et les facteurs de croissance activent mTORC1 par 2 voies de signalisation intracellulaires : PI3K/Akt et la voie Ras-Erk selon le signal extracellulaire activateur. L'insuline et l'IGF activent préférentiellement la voie pI3K/Akt. Les protéines composant ces voies sont codés par des oncogènes ou par des gènes suppresseurs de tumeurs, et peuvent activer mTORC1 dans près de 80% des cancers. Les protéines kinases Akt et Erk favorisent l'accumulation de Rheb GTP en phosphorylant et en inhibant le complexe TSC2, permettant l'activation de mTORC1. Akt semble également capable de phosphoryler PRAS40, un des composants du complexe mTORC1 et ERK peut phosphoryler raptor (Albert et Hall, Current Opinion in Cell Biology 2015).
- **Les acides aminés, dont la leucine**, régulent positivement la voie mTORC1 (Guertin et al., 2006). Des études de culture cellulaire suggèrent que la voie mTORC1 est particulièrement sensible aux diminutions de la leucine, l'arginine et la glutamine. mTORC1 pourrait détecter un acide aminé en particulier ou bien le pool intracellulaire global d'acides aminés. Les mécanismes intracellulaires par lesquels les acides aminés activent mTORC1 semblent impliquer le complexe Ragulator et les protéines Rag (Dibble et Manning, Nat Cell Biol 2013).  
D'autres travaux évoquent un lien entre les nutriments et les facteurs de croissance dans l'activation de mTORC1. L'intégration spacio-temporelle de ces différents signaux pourrait moduler mTORC1 (Dibble et Manning Nat Cell Biol 2013).
- **La disponibilité du glucose** semble également moduler l'activité de mTORC1. Au niveau musculaire, l'inhibition chimique du métabolisme du glucose par du 2-deoxyglucose (un analogue du glucose non métabolisable qui empêche l'utilisation du glucose au niveau intracellulaire) (Dennis et al., 2001) et l'activation de l'AMPK par la diminution des niveaux de glucose inhibent l'activité de mTORC1. Au niveau pancréatique, l'insulino-sécrétion induite par le glucose dépend de mTORC1 (McDaniel et al., 2002).
- **Les lipides** sont capables d'activer la voie mTORC1 selon des mécanismes intracellulaires qui dépendent de la  $\beta$ -oxydation des acides gras ou de la signalisation impliquant des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Castaneda Plos One 2012 ; Arous Diabetologia 2011 ; Mordier Biochem Biophys Res Commun).
- **Le statut énergétique cellulaire** module la voie mTORC1 par le biais de l'AMPK (Laplanche and Sabatini, 2009). En réponse à une déplétion énergétique (ratio

ATP/ADP bas), l'AMPK est activée et phosphoryle TSC2, ce qui augmente l'activité GAP de TSC2 via Rheb et diminue l'activité mTORC1 (Inoki et al., 2003). L'AMPK peut également diminuer l'activité de mTORC1 en réponse à la déplétion en énergie en inhibant directement Raptor par phosphorylation (Gwinn et al., 2008).

- **Les niveaux en O<sub>2</sub>** modulent également l'activité mTORC1 par différentes voies (Wouters and Koritzinsky, 2008). En cas d'hypoxie modérée, la réduction des niveaux d'ATP active AMPK qui promeut l'activation de TSC1/2 et inhibe la voie mTORC1 (Arsham et al., 2003) (Liu et al., 2006). L'hypoxie peut également activer TSC1/2 par la régulation transcriptionnelle de REDD1 (DNA Damage response 1) (Reiling and Hafen, 2004). REDD1 bloque la voie mTORC1 en libérant TSC2 de son association induite par les facteurs de croissance avec les protéines 14-3-3.

### c) **Les protéines effectrices de la voie mTORC1**

Parmi les nombreux effecteurs de mTORC1, les cibles d'aval les mieux caractérisées sont la protéine kinase ribosomale p70S6K1 (S6K1) et la protéine 4E-BP1 (4E-Binding protein 1). **(Figure 8)**

- De nombreux travaux sur l'activité de mTORC1 et son inhibiteur, la rapamycine, utilisent le statut de phosphorylation de **la S6K1**, une sérine thréonine kinase (Peterson et al., 1999), sur les thréonines 37, 41 et 70, comme témoin de l'activité de mTOR.

Chez l'homme et la souris, il existe 2 gènes S6K : S6K1 et S6K2, produisant chacun 2 isoformes par épissage alternatif (Avruch et al., 2001). L'isoforme la plus courte p70S6K migre à 70kDa et présente une localisation cytoplasmique. L'isoforme la plus longue p85S6K migrant à 85kDa est retrouvée majoritairement dans le noyau. L'activation des protéines S6K1 nécessite la phosphorylation d'au moins 7 sites par de multiples kinases, dont mTOR (Saitoh et al., 2002) (Kim et al., 2002).

L'AMPK régule négativement mTOR et peut également induire une diminution de la phosphorylation de S6K1 (Kimura et al., 2003). En cas d'activation chronique de la voie mTORC1, S6K1 peut exercer un effet inhibiteur sur l'activation PI3K/Akt induite par l'insuline (Um et al., 2004).

- Une fois activée, S6K phosphoryle la petite **protéine ribosomale S6** localisée dans la petite sous unité ribosomale 40S, notamment sur les résidus Ser 235/236 (Averous and

Proud, 2006)a. L'activation de S6 par S6K1 entraîne une augmentation de la biogénèse des ARNm et régule la taille et la croissance cellulaire (Laplanche and Sabatini, 2009).

- mTORC1 phosphoryle également **4EBP1**, une protéine régulatrice négative de la traduction (Poulin et al., 1998) qui se fixe sur la protéine **eIF4E** (RNA binding protein) empêchant l'initiation de la traduction des ARNm. La phosphorylation de 4EBP1 crée une répulsion électrostatique entre 4EBP1 et eIF4E, permettant la libération d'eIF4E et donc l'initiation de la traduction (Gross et al., 2003).

L'état de phosphorylation de S6K1, S6 et 4EBP1 est souvent utilisé comme un marqueur de l'activation de mTORC1 dans les cellules et les tissus.

## **. PARTIE 2. Le rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique**

L'hypothalamus constitue une structure clé dans la régulation de la balance énergétique. Il intègre les différents signaux d'origine périphérique tels que les nutriments (glucose, lipides, acides aminés) et les hormones (leptine, insuline, ghréline) et y répond en élaborant d'autres signaux complexes agissant sur le système nerveux autonome et les organes périphériques impliqués dans la balance énergétique (estomac, intestin, foie, pancréas, muscle et tissu adipeux). L'hypothalamus contrôle ainsi la prise alimentaire, le métabolisme des nutriments et la dépense énergétique.

### **1. Structures impliquées dans l'intégration centrale des signaux**

#### **a) L'hypothalamus**

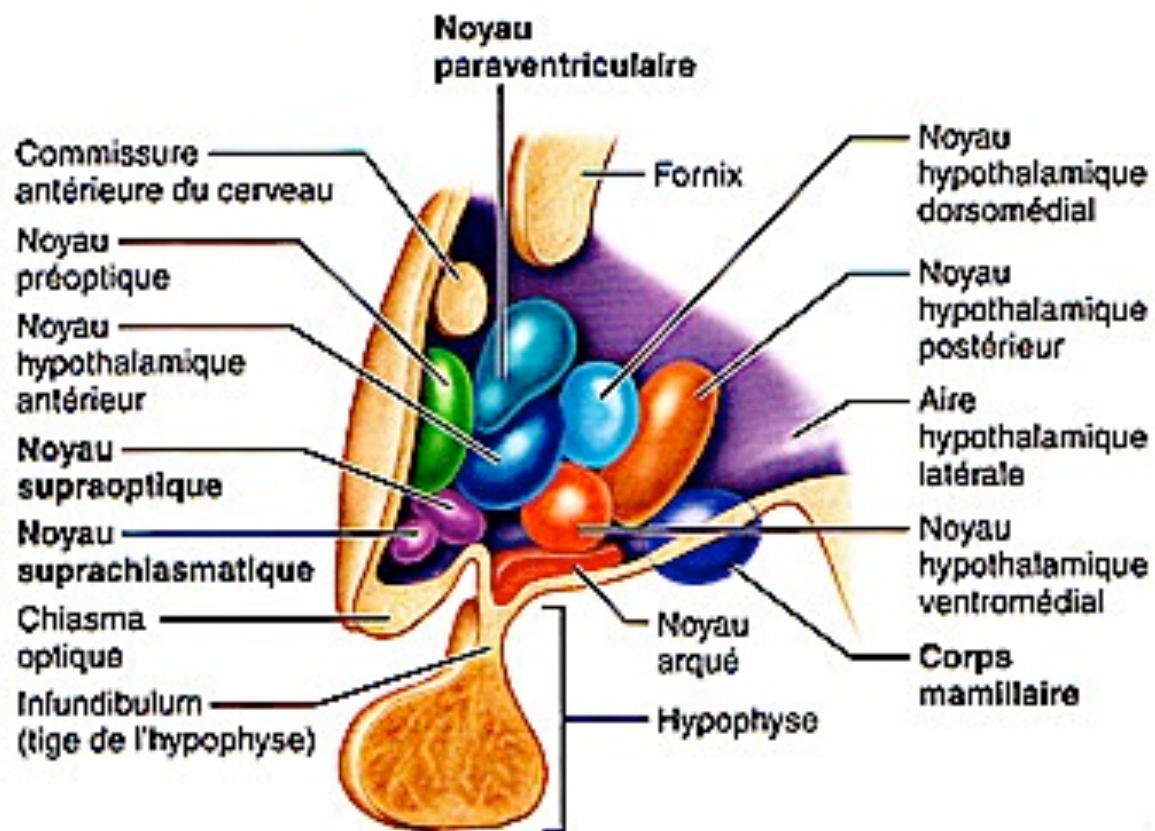
L'hypothalamus est situé à la base du cerveau, au dessus du tronc cérébral, sous le thalamus et il est séparé par le sillon de Monroe. Il forme le plancher et les parois inféro-latérales du 3<sup>ème</sup> ventricule (**Figure 9**). Il est délimité en avant par les chiasmas optiques, en arrière par le tegmentum mésencéphalique et il est relié à l'hypophyse par la tige infundibulaire et l'éminence médiane.

On distingue :

- **l'hypothalamus antérieur** composé des noyaux préoptiques périventriculaires, médian et latéral et du noyau suprachiasmatique (SCN)
- **l'hypothalamus moyen** composé du noyau arqué (ARC), du noyau ventromédian (VMN), du noyau dorsomédian (DMH), du noyau paraventriculaire (PVN), du noyau supraoptique (SON), du noyau périventriculaire (aPV), des corps mamillaires et du noyau hypothalamique postérieur
- **l'hypothalamus postérieur** comprenant l'aire hypothalamique latérale et les corps mamillaires.

Chacune de ces parties comprend plusieurs groupements de neurones (ou noyaux hypothalamiques) qui sont interconnectés de manière précise et spécifique, établissant des projections neuronales vers d'autres groupements de neurones. Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ont été identifiés grâce à de nombreux

travaux étudiant les conséquences de lésions focales de régions spécifiques hypothalamiques sur la prise alimentaire et le poids corporel (Elmqvist et al., 1999).



**Figure 9. Localisation anatomique des différents noyaux hypothalamiques** (Williams et al., 2001). Le noyau arqué (ARC) est situé à proximité de l'éminence médiane. Il projette sur d'autres noyaux comme les noyaux ventromédians et dorsomédians, l'hypothalamus latéral et le noyau paraventriculaire.

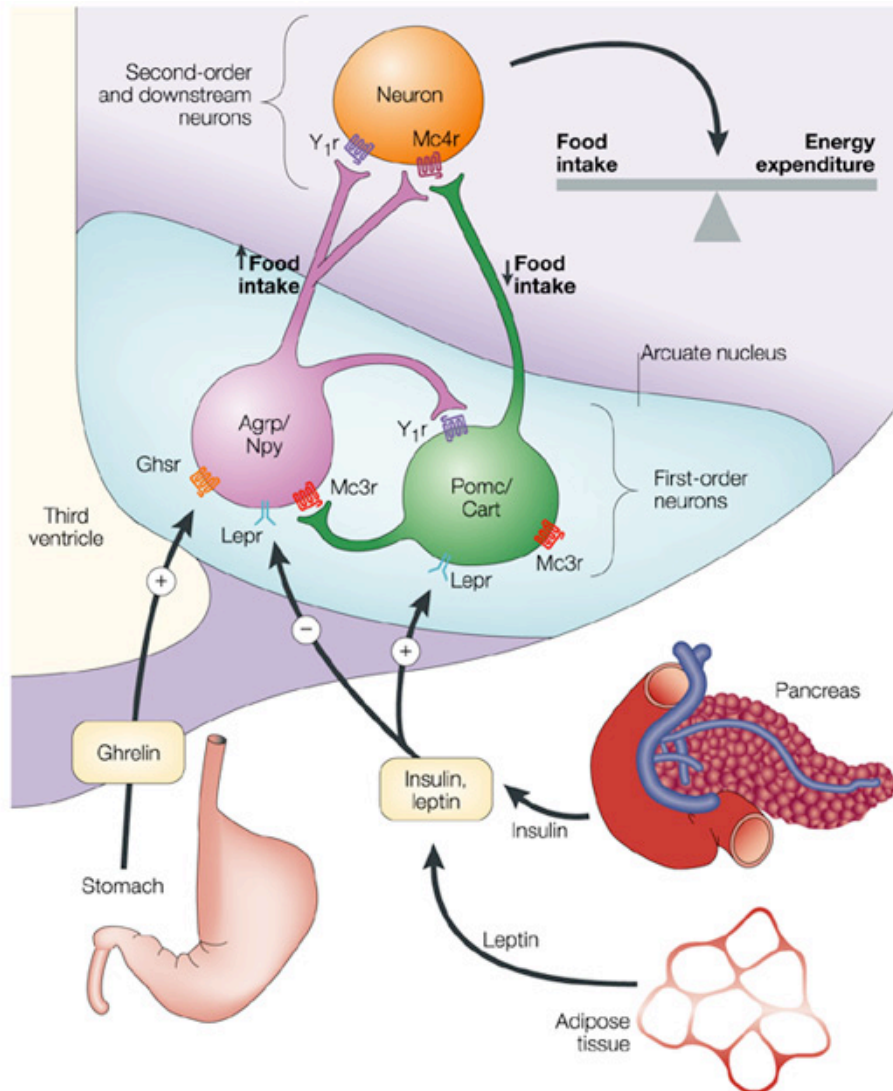
#### **b) Le noyau arqué**

Le noyau arqué (ARC) est situé dans l'hypothalamus médiobasal, de chaque côté du 3<sup>ème</sup> ventricule, à proximité de l'éminence médiane, un organe circumventriculaire où les échanges sang/cerveau sont facilités par la présence de vaisseaux fenêtrés, une zone où la barrière hémato-encéphalique est incomplète ou perméable (Belgardt et al., 2009) ce qui facilite la capacité de l'ARC à détecter les signaux périphériques.

L'ARC, contenant des neurones dits de « premier ordre » car étant stimulés directement par les signaux circulants, (Ciofi et al., 2009) (Cone et al., 2001) et présente des projections vers les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la BE (contenant les neurones dits de « second ordre ») ainsi que vers le tronc cérébral (**Figure 10**).

Parmi les neurones de l'ARC, 2 populations neuronales aux actions antagonistes sont particulièrement étudiées dans la balance énergétique : les neurones POMC/CART et

AgRP/NPY. Leur importance dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est illustré dans différents modèles pathologiques animaux ou humain ((Elmqvist, 2001). Des mutations inactivatrices du gène POMC sont décrites chez l'homme et provoquent une obésité morbide et précoce (Krude et al., 1998) (Krude and Grüters, 2000).



**Figure 10. La régulation hypothalamique de la balance énergétique.**

(Barsh and Schwartz, 2002)

L'hypothalamus reçoit les signaux nutritionnels et hormonaux périphériques qui sont d'abord intégrés au niveau des neurones de 1<sup>er</sup> ordre du noyau arqué qui émettent des projections vers les neurones de 2<sup>ème</sup> ordre impliqués dans la régulation de la balance énergétique. (Schwartz et al., 1997). Le système mélanocortine est constitué des neurones anorexigènes POMC et orexigènes NPY/AgRP, neurones dits de premier ordre, qui projettent au niveau des neurones de second ordre, notamment au niveau du PVN. Ces neurones interagissent entre eux en réponse aux signaux périphériques comme la leptine et la ghréline.

### **Les neurones POMC**

Les neurones POMC sont principalement exprimés au niveau de l'ARC, mais sont également retrouvés au niveau de l'hippocampe et du NTS (Berthoud et al., 2006) (Cone, 2005). Les neurones POMC coexpriment les peptides anorexigènes : la propiomélanocortine (POMC) et le CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript). L'expression de POMC est modulée par la prise alimentaire (Breen et al., 2005). Les neurones POMC sont activés lors d'un repas, entre autres par la leptine, et contrôlent la taille du repas (Olszewski et al., 2001). Ils expriment le récepteur de la leptine (ObR), qui est capable d'induire une augmentation de l'expression de l'ARNm de POMC au niveau de l'ARC. L'expression de POMC est diminuée dans l'ARC des souris ob/ob ou db/db (avec altération constitutive de la leptine (ob/ob) ou de son récepteur (db/db)) (Schwartz et al., 1997). L'action anorexigène de POMC est médiée par l'  $\alpha$ -MSH, un des produits du clivage de POMC, qui se fixe sur les récepteurs à la mélanocortine MC4R au niveau des neurones de second ordre (VMN et PVN). La POMC peut également agir sur les récepteurs MC3R (récepteurs aux mélanocortines 3) exprimés au niveau des neurones AgRP/NPY.

L'injection ICV de CART ou d'  $\alpha$ -MSH entraîne une diminution de la prise alimentaire chez les rongeurs (Kristensen et al., 1998) tandis que l'injection de NPY (neuropeptide Y, sécrété par les neurones NPY/AgRP) diminue l'expression de POMC (Schwartz et al., 1997).

### **Les neurones NPY/AgRP**

Les neurones NPY/AgRP coexpriment les neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (Agouti related peptide) (Grill and Kaplan, 2002) (Hillebrand et al., 2002). L'expression du gène et la libération du peptide NPY sont stimulés en cas de balance énergétique négative, en situation de jeune ou d'hypoglycémie (Leibowitz and Wortley, 2004). La ghréline, les glucocorticoides, l'hypoglycémie et l'alimentation hyperlipidique ou riche en carbohydrates activent les neurones NPY alors que l'insuline et la leptine l'inhibent (Williams et al., 2001). Le NPY exerce son effet orexigène en se fixant sur son récepteur couplé à une protéine G (type Y1 ou Y5) au niveau des neurones cibles de l'ARC (Kushi et al., 1998) (Schaffhauser et al., 1997).

L'injection intraventriculaire (ICV) de NPY (Stanley et al., 1986) ou d'AgRP (Levin et al., 2004) stimule la prise alimentaire et la prise de poids et diminue la dépense énergétique en diminuant l'activité thermogénique du tissu adipeux brun. L'injection continue ou répétée de NPY conduit à une obésité, une hyperphagie, une hyperinsulinémie basale et une augmentation de la lipogénèse dans le foie et le tissu adipeux (Zarjevski et al., 1993).



L'AgRP exerce son effet orexigène de manière différente, en se fixant comme antagoniste de MC4-R et MC3-R, qui lient habituellement l' $\alpha$ -MSH, libéré par les neurones POMC, au niveau des neurones de second ordre (Leibowitz and Wortley, 2004).

### **Le système mélanocortine (Figure 10)**

Le système mélanocortine hypothalamique est un circuit neural formé par des cellules exprimant soit la POMC et ses dérivés (l'ACTH et l' $\alpha$ -MSH), agonistes des MCRs (récepteurs aux mélanocortines); soit l'AgRP, antagoniste endogène des MCRs, et aussi par des cellules exprimant les MCRs, cibles de ces 2 populations neuronales et comportant les neurones dits de second ordre au niveau du PVN, VMN, DMH (De Jonghe et al., 2011).

Selon l'état énergétique de l'individu, ces 2 populations neuronales vont réagir différemment et de manière complémentaire et coordonnée en réponse aux signaux périphériques.

Lors de la prise alimentaire, l'activité électrique des neurones anorexigènes et l'expression de la POMC/CART augmentent et l'activité électrique des neurones orexigènes et l'expression du NPY/AgRP diminuent. Ces activations neuronales entraînent une cascade de signalisations intracellulaires complexes, partiellement connues, qui aboutissent à une sensation de satiété, une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique.

A l'inverse, lors d'un jeûne, l'activité des neurones anorexigènes diminue, celle des neurones orexigènes augmente ce qui aboutit à une augmentation de l'appétit, de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique.

Ces différents neurones semblent interagir entre eux sous la forme d'un rétrocontrôle : les neurones AgRP peuvent réguler l'activité des neurones POMC et inversement (Varela and Horvath, 2012).

Parmi les neurones POMC et AgRP/NPY, plusieurs sous-populations neuronales se distinguent selon leur capacité à répondre à la leptine, à l'insuline ou selon le type de neurotransmetteurs comme l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC) ou le glutamate (Hentges et al., 2009).

Afin de coordonner la régulation de la balance énergétique, les neurones AgRP et POMC envoient des projections vers d'autres aires cérébrales. L' $\alpha$ -MSH active des populations neuronales de 2ème ordre au niveau de différents noyaux hypothalamiques tels que le LH, le PVN et le VMN, mais également le noyau parabrachial (PBN), l'amygdale et le noyau du tractus solitaire (NTS) (Belgardt and Brüning, 2010). Certaines de ces projections sont

également connectées avec des neurones du système nerveux sympathiques (SNS) ou avec des neurones sensibles à la distension gastrique.

### c) Les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique

#### (Figure 9)

**Le noyau ventromédian (VMN)** constitue un centre de satiété et joue un rôle dans l'homéostasie glucidique. Les neurones de ce noyau peuvent être ou bien activés ou bien inhibés par le glucose (Fioramonti et al., 2011) (Song et al., 2001). Le VMN reçoit et émet des projections de l'ARC dont des projections glutamatergiques vers les neurones POMC (Sternson et al., 2005), mais aussi vers le PVN, la LH, le DMH et le NTS (McClellan et al., 2006) (Canteras et al., 1994).

**Le noyau paraventriculaire (PVN)** est une des régions les plus innervées par les neurones POMC et NPY (Cone, 2005). Les MC3R et les MC4R sont exprimés au niveau des neurones du PVN qui sont la cible des neurones de 1<sup>er</sup> ordre POMC et AgRP de l'ARC (Woods, 2005). Le PVN reçoit aussi des afférences du VMN, du LH et du NTS (noyau du tractus solitaire). Il est particulièrement impliqué dans la réponse de prise alimentaire induite par le jeune (Singru et al., 2007) et dans la réponse induite par les neurones orexigènes NPY (Nguyen et al., 2012).

**Le noyau dorsomédian (DMH)** fait également partie des noyaux hypothalamiques cibles du système mélanocortine. Il exprime les MC3R et MC4R et reçoit des projections des neurones POMC/CART et NPY/AgRP provenant de l'ARC. Le DMH est un site d'action de la leptine (Enriori et al., 2011). Les neurones du DMH qui expriment les récepteurs Y1 et Y5 sont les cibles des neurones NPY de l'ARC et sont impliqués dans l'effet orexigène du peptide et le maintien de l'homéostasie glucidique (Zhu et al., 2012).

**Le noyau suprachiasmatique (SCN)** régule les rythmes circadiens en intégrant les signaux environnementaux et internes corporels, en favorisant leur synchronisation et en induisant l'expression de « gènes horloges » qui vont rythmer l'expression et la libération de différents neuropeptides tels que le VIP (vasopressive intestinal peptide), l'AVP (vasopressine) et le peptide libérant de la ghréline (GRP) qui sont aussi impliqués dans la régulation de la balance énergétique (Albrecht, 2012). Le SCN envoie des projections vers l'ARC, le PVN et le DMH, influençant les signaux émis par ces populations neuronales en fonction des conditions environnementales et de l'état métabolique de l'organisme.

**L'aire latérale hypothalamique (LH)** régule la prise alimentaire par ses connexions avec les autres noyaux hypothalamiques, le système limbique et d'autres régions extracérébrales. Il contient des neurones sécrétant l'hormone de concentration de la mélanine qui stimule la prise alimentaire, des neurones sécrétant les orexines qui augmentent l'appétit et qui sont activés par le jeûne et la ghréline, des neurones sensibles au glucose et au NPY (Marston et al., 2011).

## **2. Les signaux périphériques intégrés au niveau hypothalamique**

### **a) Les signaux anorexigènes**

#### **(i) La leptine**

La leptine est une hormone satiétogène, sécrétée par le tissu adipeux. Les concentrations plasmatiques de leptine reflètent la quantité de la masse adipeuse, modulant la prise alimentaire à long-terme (Friedman and Halaas, 1998). La leptinémie plasmatique varie également à court-terme : elle diminue lors du jeûne et s'élève 4 à 5h après la prise alimentaire (Kolaczynski et al., 1996). La leptine traverse la barrière hémato-encéphalique et se lie à son récepteur ObR au niveau des neurones hypothalamiques, informant le SNC du statut énergétique de l'organisme (Klok et al., 2007).

Au niveau hypothalamique, la liaison de la leptine (codée par le gène *ob*) à son récepteur transmembranaire (ObR, codé par le gène *db*) modifie l'expression et la sécrétion du NPY et de la POMC. Les neurones POMC et AgRP expriment ObR et sont inversement régulés par la leptine. L'activation de ObR dans les neurones POMC induit une dépolarisation de ces cellules (Cowley et al., 2001) et inhibe les neurones NPY/AgRP (Hill et al., 2010). L'administration centrale (ICV) ou périphérique de leptine entraîne une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Wang et al., 1997). Le jeûne alimentaire (36h ou 3 jours) entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de leptine et de l'ARNm de POMC au niveau hypothalamique (Mizuno et al., 1998). Chez les patients obèses, les concentrations de leptine plasmatique sont augmentées et cet état d'hyperleptinémie est donc associé à une résistance à la leptine au niveau central et périphérique (Sáinz et al., 2015). Les modèles génétiques de rongeur avec altération du gène de la leptine (souris *ob/ob*) ou de son récepteur ObR (souris *db/db*) sont obèses, hyperphagiques et diabétiques. Chez les souris *ob/ob* ou *db/db*, l'ARNm POMC en conditions de base (en cas d'accès libre à la nourriture) diminue de

60% par rapport aux souris sauvages. Le traitement par leptine permet de restaurer partiellement les niveaux d'ARNm POMC chez les souris ob/ob (Mizuno et al., 1998).

La leptine favorise aussi la dépense énergétique en modulant le métabolisme basal (réduction du quotient respiratoire, indiquant une réduction de l'oxydation du glucose et une augmentation de l'oxydation des acides gras ; réduction de la température corporelle et de la consommation en O<sub>2</sub> chez les animaux ob/ob) et l'activité physique, chez les souris ob/ob (Breslow et al., 1999) (Hwa et al., 1997) et chez les animaux non mutés (Scarpace et al., 1997). Ces effets impliqueraient une augmentation de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun avec une augmentation de l'expression locale d'UCP. Les études chez l'homme ne retrouvent cependant pas de corrélation entre les taux plasmatiques de leptine et le métabolisme/la dépense énergétique chez des humains sains et obèses (Levine et al., 1999) (Klok et al., 2007).

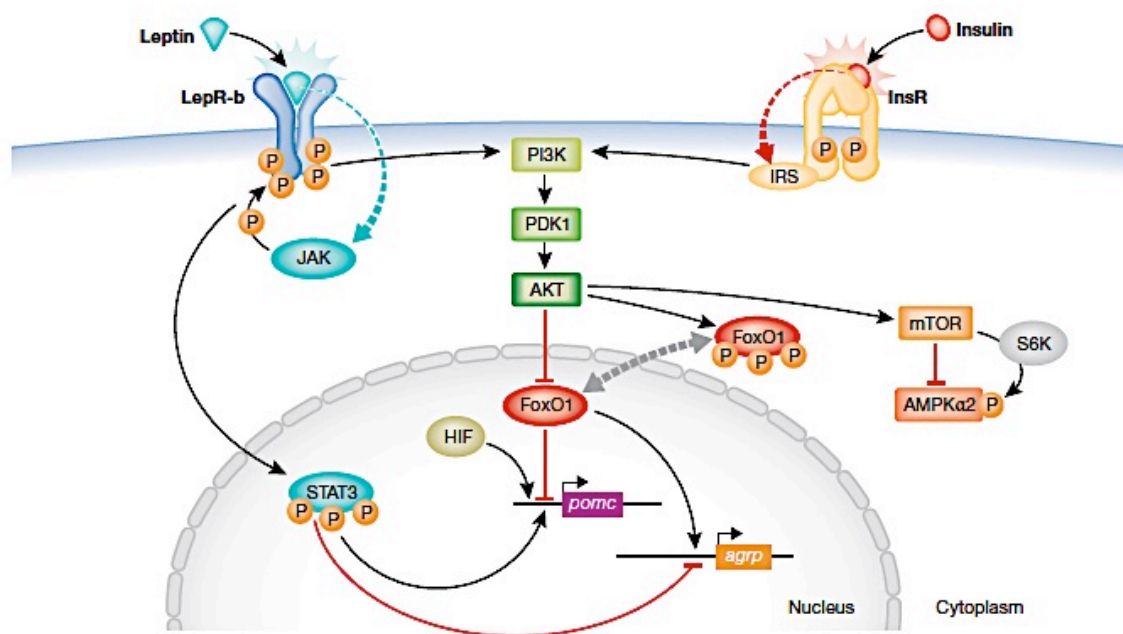
La leptine est capable d'activer la voie PI3K / mTORC1, la voie Jak/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) et la voie des MAPK au niveau des neurones anorexigènes POMC (Varela and Horvath, 2012) (**Figure 11**). Différents mécanismes intracellulaires semblent potentiellement impliqués dans l'effet anorexigène de la leptine et les conditions d'activation de chacune de ces 3 voies dans la régulation de la balance énergétique restent méconnues.

## **(ii) L'insuline**

L'insuline, sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques, régule l'homéostasie glucidique en agissant notamment sur la captation du glucose au niveau des organes périphériques (Bagdade et al., 1967). Au niveau périphérique, l'insuline a un effet anabolique, favorisant la mise en réserve de l'énergie dans les tissus, mais au niveau central, l'insuline a un effet catabolique en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique (Brown et al., 2006). Les récepteurs à l'insuline sont abondamment exprimés au niveau de l'hypothalamus médiobasal et en particulier au niveau de l'ARC (Plum et al., 2005).

L'insuline ICV provoque une diminution de l'expression de NPY (Obici et al., 2001), une hyperpolarisation des neurones POMC de l'ARC (Hill et al., 2010) et une augmentation de l'expression de POMC (Benoit et al., 2002). Les souris déficientes pour le récepteur à l'insuline (IR) au niveau du cerveau deviennent obèses avec une augmentation de la prise

alimentaire, de la masse grasse et du poids corporel (Brüning et al., 2000). L'ablation spécifique de l'IR au niveau des neurones POMC ou AgRP n'a pas d'effet sur le poids corporel ou la prise alimentaire (Könner et al., 2007) mais modifie le métabolisme glucidique périphérique. L'effet de l'insuline sur les neurones AgRP entraîne une inhibition de la production hépatique de glucose (Okamoto et al., 2004) alors que l'activation de l'IR au niveau des neurones POMC favorise au contraire la production hépatique de glucose et la dépense énergétique (Lin et al., 2010). Ainsi les neurones POMC et AgRP modulent les effets centraux de l'insuline sur l'homéostasie glucidique périphérique. D'autres populations neuronales hypothalamiques comme les neurones du VMN sont aussi probablement impliqués dans les effets de l'insuline sur la régulation du poids corporel et de la prise alimentaire (Varela and Horvath, 2012).



**Figure 11. Voies de signalisations intracellulaires activées par la leptine ou l'insuline au niveau des neurones du noyau arqué.** (Varela and Horvath, 2012)

La leptine se fixe à son récepteur LepR ce qui entraîne la phosphorylation de Jak et l'activation par phosphorylation de STAT3 qui peut alors migrer jusqu'au noyau, se liant aux promoteurs de gènes cibles, activant la transcription du gène POMC et inhibant la transcription du gène AgRP.

La leptine et l'insuline sont capables d'activer la voie PI3K, qui inhibe par phosphorylation le facteur de transcription FOXO1, levant ainsi l'inhibition de l'expression du gène POMC et permettant à STAT3 de se lier aux promoteurs POMC et AgRP.

L'activation de la voie PI3K favorise également l'inhibition de l'AMPK par mTOR.

### **Les voies de signalisation activées par la leptine et l'insuline au niveau hypothalamique**

La leptine et l'insuline sont capables d'activer les mêmes protéines (dont PI3K/Akt, mTOR et AMPK) et de moduler l'expression de facteurs de transcription dont FOXO1 (Ren et al., 2012) au niveau hypothalamique. (**Figure 11**)

De manière intéressante, il a été montré que l'insuline et la leptine sont toutes les 2 capables d'activer PI3K, mais l'activation de PI3K par la leptine induit une dépolarisation neuronale alors que l'activation de PI3K par l'insuline induit au contraire une hyperpolarisation neuronale. Les mécanismes exacts de ces processus sont mal connus, mais une différence dans la durée ou l'intensité d'activation de la PI3K est suspectée pour expliquer ces effets différentiels pour les 2 hormones anorexigènes (Belgardt et al., 2009).

La leptine ou l'insuline sont également capables d'activer la phosphorylation de FoxO1, facteur de transcription inhibiteur de l'expression de POMC (Kitamura et al., 2006), qui est alors exporté du noyau, permettant la liaison de STAT3 au promoteur de POMC pour stimuler l'expression de POMC. Dans les neurones AgRP, l'exportation nucléaire de FoxO1 empêche l'expression de l'AgRP car STAT3 est capable de se lier au promoteur de l'AgRP et d'inhiber son expression (Morrison et al., 2005) (Ren et al., 2012).

La leptine et l'insuline, signalant un excès de substrats énergétiques, inhibent également l'AMPK hypothalamique et ses cibles (Claret et al., 2007).

### **(iii) Les nutriments**

#### **– Le glucose**

Une diminution de la glycémie induit une stimulation de la prise alimentaire par l'activation des neurones anorexigènes NPY/AgRP et par des signaux de « contre-régulation » incluant la sécrétion de glucagon ou de catécholamines (Biggers et al., 1989) (Nonogaki, 2000). L'hyperglycémie, au contraire, favorise la diminution de la prise alimentaire, stimule la sécrétion d'insuline, diminue la production hépatique de glucose au niveau périphérique et active les neurones de l'ARC (Leloup et al., 2006) et du PVN (Guillod-Maximin et al., 2004). Un tiers des neurones NPY sont sensibles au glucose et sont activés par une diminution du glucose (Fioramonti et al., 2007) alors qu'environ 50% des neurones POMC semblent sensibles au glucose et peuvent être activés par une augmentation de la glycémie (Parton et al., 2007).

Les mécanismes intracellulaires de détection du glucose au niveau hypothalamique sont encore mal connus. Ils semblent faire intervenir GLUT2 (Glucose Transporter 2)/Glucokinase et les canaux potassiques ATP dépendants, mais aussi l'AMPK et les ROSm (Claret et al., 2007) (Leloup et al., 2011) (Leloup et al., 2006). La diminution de la prise alimentaire induite par la détection hypothalamique du glucose dépend d'une augmentation transitoire des ROS au niveau hypothalamique (Leloup et al., 2006). Le métabolisme du glucose entraîne une augmentation de la synthèse d'ATP au niveau des neurones POMC, qui conduit à la fermeture de canaux potassiques ATP dépendants et mène à la dépolarisation membranaire (Nasrallah and Horvath, 2014).

En cas de diminution de la glycémie, la décharge neuronale (Fioramonti et al., 2007) et la  $\beta$  oxydation des acides gras augmentent au niveau des neurones AgRP/NPY. Lors du jeûne, l'activité hypothalamique de l'AMPK augmente (Kahn et al., 2005) (Minokoshi et al., 2004) (McCrimmon et al., 2004) les niveaux d'UCP2 et entraîne une diminution des niveaux de ROS et une diminution de l'activité des neurones POMC (Nasrallah and Horvath, 2014).

Chez les souris obèses (DIO), la sensibilité des neurones POMC au glucose est altérée. En conditions d'alimentation standard, 50% des neurones POMC sont sensibles au glucose et après 8 semaines de régime HFD, seulement 10% des neurones POMC sont encore sensibles au glucose. L'inhibition pharmacologique aigue d'UCP2 rétablit la sensibilité au glucose au niveau des neurones POMC (Parton et al., 2007). Ainsi, la protéine UCP2, qui est capable de diminuer les ROS au niveau des neurones NPY/AgRP (Andrews et al., 2008) pourrait être impliquée dans la perte de sensibilité des neurones POMC observée en cas d'obésité (Chapman, 2008).

### **– Les acides gras**

Chez la souris, une perfusion ICV d'acide gras pendant 6h induit au niveau central une diminution de la prise alimentaire associée à une diminution de l'expression du NPY sans variation de l'expression de POMC et au niveau périphérique une diminution de la production hépatique de glucose et une stimulation de l'insulinosécrétion induite par le glucose (Obici et al., 2002) (Clément et al., 2002).

Sur le plan intracellulaire, les AG sont capables de moduler la conductance de certains canaux ioniques et d'inhiber la Na/K ATPase (Oishi et al., 1990). L'AMPK semble également

impliquée dans le métabolisme central des acides gras en contrôlant la formation de malonyl CoA (Landree et al., 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection cérébrale des acides gras restent encore mal connus.

**– Les acides aminés :**

Les acides aminés peuvent également moduler la prise alimentaire au niveau central. L'administration centrale de leucine inhibe la prise alimentaire (Cota et al., 2006) et active les neurones POMC de l'ARC (Blouet and Schwartz, 2010) (Blouet et al., 2009). La leucine par voie orale augmente de manière aiguë la phosphorylation de S6K1 au niveau hypothalamique et induit une activation neuronale au niveau de l'aire postrema, mais pas au niveau des noyaux hypothalamiques. Cet effet est associé à une augmentation de la prise alimentaire. En cas d'administration chronique par voie orale, la leucine ne modifie pas la prise alimentaire ou le poids corporel des souris, quel que soit le régime alimentaire (standard ou HFD) (Zampieri et al., 2013). Les mécanismes intracellulaires médiant ces effets restent encore à préciser.



## **b) Les signaux hormonaux orexigènes : exemple de la Ghréline**

La ghréline est une hormone sécrétée par l'estomac (Yoshihara et al., 2002), responsable de la sensation de faim et de l'initiation de la prise alimentaire. Sa concentration plasmatique augmente juste avant les repas, puis diminue rapidement ensuite (Cummings et al., 2001). Elle varie également dans la journée et selon l'âge, le sexe, l'index de masse corporelle (IMC), le glucose et l'insuline (Ariyasu et al., 2001). La ghréline agit en se liant à son récepteur GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) au niveau des organes cibles et en particulier au niveau de l'ARC (Horvath et al., 2001). Elle est antagoniste de la leptine au niveau hypothalamique : elle stimule les neurones orexigènes (NPY, AgRP) de l'ARC, inhibe l'activité des neurones POMC (Cowley et al., 2003a) et diminue l'action anorexigène de la leptine (Kamegai et al., 2001) sans pour autant qu'une action directe de la ghréline sur la leptine n'ait été prouvée (Sun et al., 2003).

L'administration parentérale d'une dose unique de ghréline augmente la prise alimentaire. L'administration chronique périphérique de ghréline chez le rat induit une hyperphagie persistante et une augmentation de l'adiposité (Tschöp et al., 2000). Les concentrations plasmatiques de ghréline sont diminuées chez les sujets obèses et augmentent en cas d'amaigrissement. (Hansen et al., 2002).

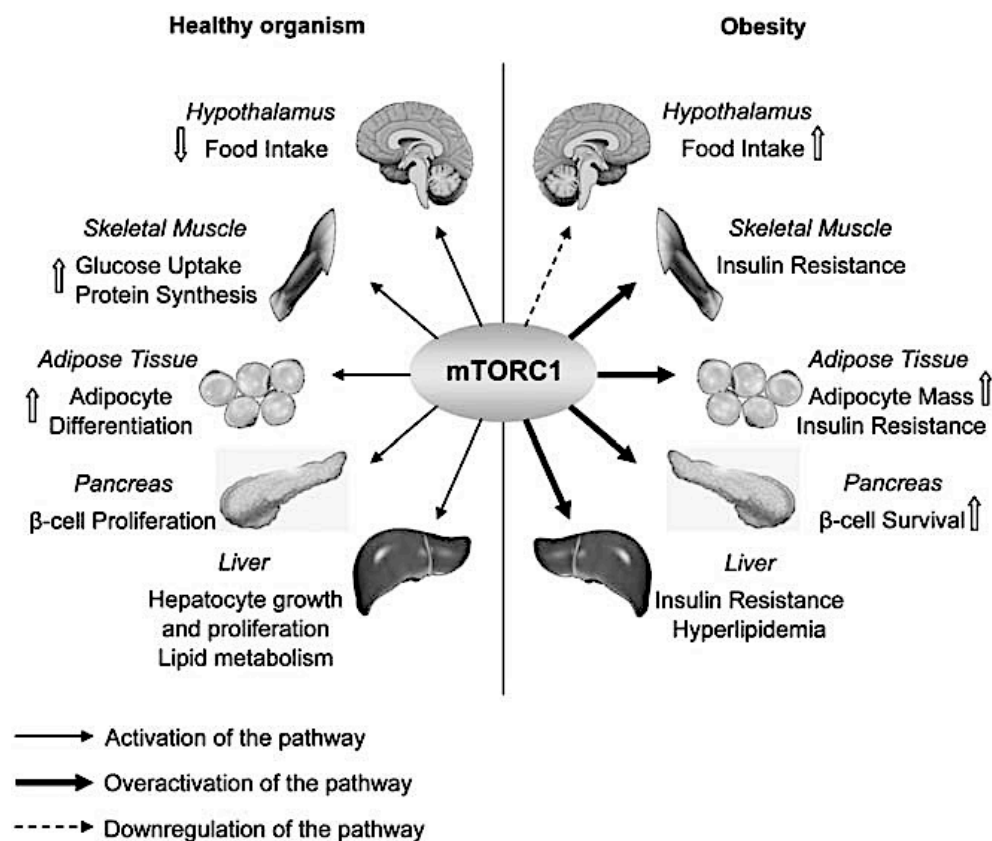
Ces différents signaux hormonaux de régulation de la prise alimentaire reflètent le statut énergétique de l'organisme et vont agir et interagir au niveau central afin de moduler à long-terme la balance énergétique. En cas de dérégulation chronique de la balance énergétique (DIO), ces systèmes de régulation physiologique sont affectés et les conséquences exactes sur la signalisation intracellulaire dans les neurones POMC ou AgRP/NPY de l'ARC constituent des pistes d'études intéressantes pour le traitement de l'obésité.

## . PARTIE 3. L'implication de mTORC1 et des ROS dans la régulation de la balance énergétique.

mTORC1 et les ROS sont impliqués dans le métabolisme périphérique et central des nutriments et dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique. (Figure 12)

### 1. Le rôle de la voie mTORC1 dans la régulation du métabolisme

L'activité de mTORC1 régule la balance énergétique et l'homéostasie métabolique générale en modulant l'activité de certaines populations neuronales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel, et aussi en déterminant le stockage et l'utilisation des substrats énergétiques au niveau des tissus périphériques.



**Figure 12.** Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la balance énergétique au niveau périphérique et central, dans des conditions physiologiques et dans des conditions d'obésité induite par l'alimentation. (Catania et al., 2011)

## **a)      Au niveau des tissus périphériques**

L'obésité induite par l'alimentation (DIO) est associée à l'activation chronique de la voie mTORC1 au niveau du foie et du muscle (Khamzina et al., 2005) (Laplane and Sabatini, 2012b). Cette activation excessive de la voie mTORC1 participe à la résistance à l'insuline observée *in vitro* dans des cellules musculaires ou hépatiques en cas d'excès d'acides gras (Mordier and Iynedjian, 2007). L'activation excessive de mTORC1 favoriserait également le développement de la stéatose hépatique non alcoolique, une pathologie fréquente caractérisée par une accumulation de gras au niveau du foie, associée à l'obésité et au diabète de type 2 comme cela a été montré chez des souris exposées à un régime HFD ou dans des cultures cellulaires d'hépatocytes (Khamzina et al., 2005). Elle favorise également l'expansion de la masse du tissu adipeux blanc en augmentant la phosphorylation d'IRS1, menant à une résistance à l'insuline au niveau des adipocytes (Um et al., 2004). La voie mTORC1 régule positivement la masse  $\beta$  cellulaire, favorisant la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques et la synthèse d'insuline (Leibowitz et al., 2008).

La rapamycine entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras et une réduction de la biosynthèse lipidique au niveau des hépatocytes (Brown et al., 2007), diminue l'expansion clonale et la différenciation des adipocytes (Le Bacquer et al., 2007), inhibe la prolifération  $\beta$  cellulaire et aggrave l'hyperglycémie chez les animaux obèses en inhibant l'insulino-sécrétion induite par le glucose (Fraenkel et al., 2008).

## **b)      Au niveau central**

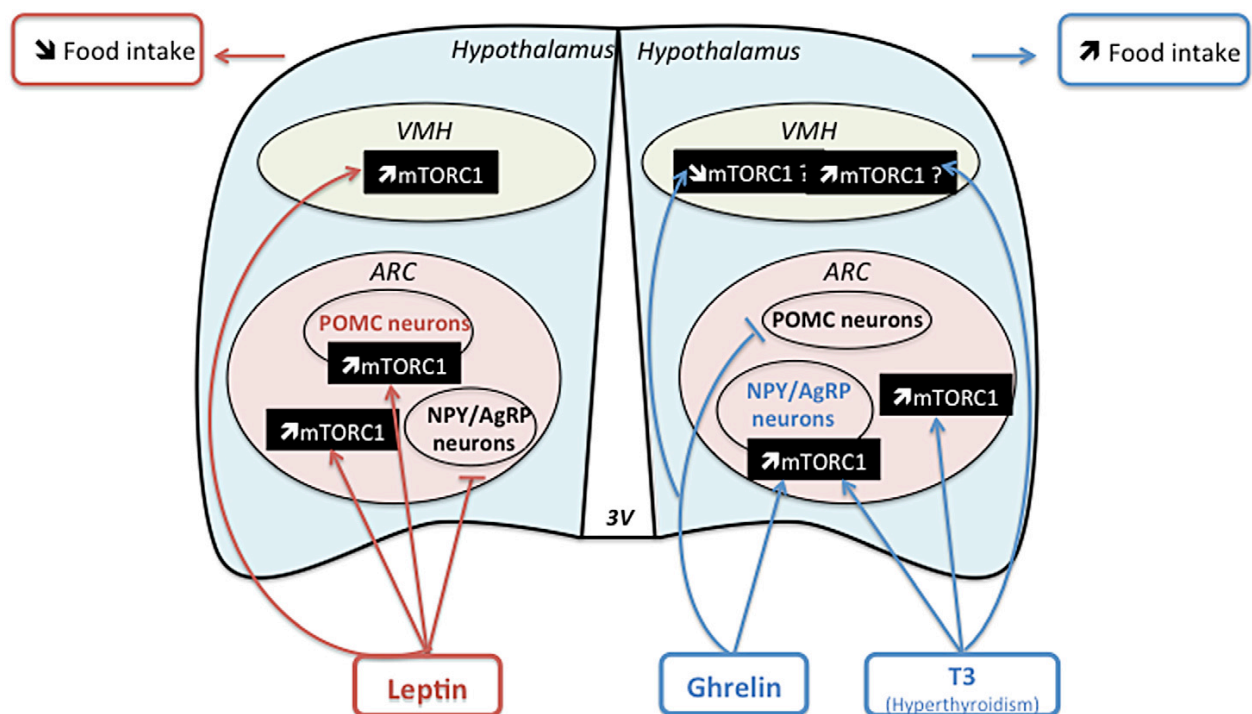
### **(i)      mTORC1 au niveau de l'hypothalamus**

De nombreuses études ont montré le rôle de la voie mTORC1 hypothalamique sur le contrôle de la prise alimentaire. En conditions d'accès libre à la nourriture (« fed » par opposition au « fasting »), l'activation de la voie mTORC1 est décrite dans plus de 90% des neurones AgRP/NPY et dans environ 40% des neurones POMC au niveau de l'hypothalamus de rats (Inhoff et al., 2010) (Cota et al., 2006). L'activation de S6K1, protéine cible de mTORC1, au niveau de l'hypothalamus médiobasal par injection d'un adénovirus, diminue la prise alimentaire et le poids corporel en inhibant l'expression de l'ARNm d'AgRP et du NPY (Blouet et al., 2008), améliore la sensibilité à la leptine et protège contre la DIO induite par un régime HFD, mais favorise la résistance à l'insuline au niveau hépatique (Blouet et al., 2008).

L'administration aigue ICV de rapamycine entraine au contraire une augmentation de la prise alimentaire à court-terme chez des rats avec accès libre à la nourriture et exposés à une nourriture palatable (Cota et al., 2006).

La délétion systémique de S6K1 protège contre la DIO et améliore l'insulino-sensibilité périphérique (Um et al., 2004). La délétion de S6K1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal restaure l'action hypothalamique de l'insuline sur l'inhibition de la production hépatique de glucose qui est altérée en cas d'alimentation HFD (Ono et al., 2008).

Ainsi, le contrôle central de la prise alimentaire et la régulation de l'homéostasie glucidique induits par la voie mTORC1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal semble impliquer la protéine S6K1 de manière différentielle. D'après ces résultats, l'activation de S6K1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal favoriserait d'une part une diminution de la prise alimentaire, mais altérerait d'autre part la sensibilité hépatique à l'insuline.



**Figure 13. Le rôle de la voie mTORC1 au niveau hypothalamique** selon les signaux périphériques hormonaux, selon les noyaux hypothalamiques et selon le type de neurones dans la régulation centrale de la balance énergétique.

L'effet anorexigène de la leptine dépend d'une augmentation de l'activation de la voie mTORC1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal (ARC et VMN). La leptine active les neurones POMC et inhibe les neurones NPY/AgRP.

La résistance à la leptine observée chez les animaux et les humains obèses est associée à une altération de la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC. (Haissaguerre et al., 2014)

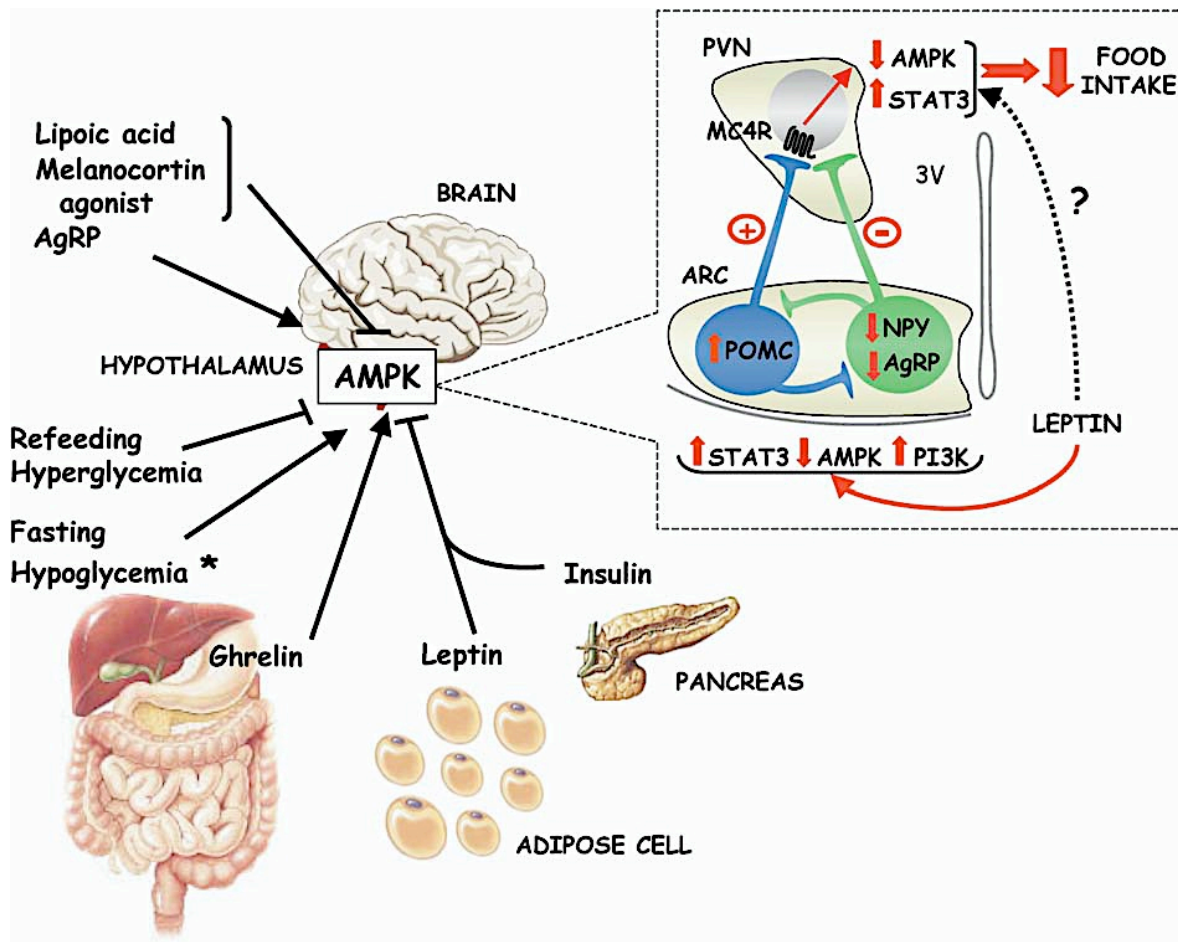
### **Leptine et mTORC1 au niveau hypothalamique:**

La leptine augmente la phosphorylation de S6K1 et S6 et inhibe l'activité de l'AMPK dans l'ARC, le VMN/DMH et le PVN (Dagon et al., 2012) (Minokoshi et al., 2004), mais ne module pas mTORC1 au niveau de l'hippocampe, du cortex ou du tronc cérébral (Harlan et al., 2013). L'action anorexigène de la leptine au niveau de l'aire tegmentaire ventrale (Hommel et al., 2006) dépend de la voie Jak/STAT et non de la voie PI3K/mTOR (Morton et al., 2009). Au niveau de l'ARC, la leptine active la voie PI3K/mTOR pour inhiber les neurones NPY/AgRP et activer les neurones POMC hypothalamiques (Cowley et al., 2003b) (Hill et al., 2008). L'administration ICV de leptine chez des rats non obèses nourris avec un régime standard entraîne une augmentation de la phosphorylation de S6K1 et S6 au niveau de l'hypothalamus médiobasal. L'administration ICV de rapamycine bloque l'effet anorexigène de la leptine en bloquant l'activation de mTORC1 au niveau hypothalamique (Cota et al., 2006).

Les souris S6K1-KO sont résistantes à l'effet anorexigène de la leptine ce qui suggère que la protéine S6K1 est particulièrement impliquée dans l'effet de la leptine sur la prise alimentaire (Cota et al., 2008).

Une exposition brève (24h) à un régime HFD entraîne une diminution de la phosphorylation basale de S6K1 au niveau de l'hypothalamus et bloque l'effet anorexigène et l'augmentation de l'activation de mTORC1 hypothalamique induits par la leptine ICV (Cota et al., 2008). La résistance à la leptine décrite dans l'obésité DIO dépend donc en partie d'une diminution de l'activation de la voie mTORC1 hypothalamique (Reed et al., 2010).

L'inhibition de l'AMPK hypothalamique est nécessaire à l'effet anorexigène de la leptine et dépend de S6K1 qui est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'AMPK (Dagon et al., 2012) (Kahn et al., 2005). L'activation constitutive de l'AMPK bloque les effets de la leptine (Minokoshi et al., 2004). En cas de régime HFD chronique, la leptine n'est plus capable d'inhiber l'activité d'AMPK dans le noyau arqué, le PVN et le VMN/DMH (Martin et al., 2006). La régulation de l'activité hypothalamique d'AMPK par la leptine est résumée dans la **Figure 14** (Kahn et al., 2005).



**Figure 14. Le rôle de l'AMPK dans la régulation de la balance énergétique.**

L'activation de l'AMPK inhibe les processus qui consomment de l'ATP, active les mécanismes de synthèse de l'ATP et favorise la prise alimentaire.

Les hormones anorexigènes comme la leptine ou l'insuline diminuent l'activité hypothalamique de l'AMPK au niveau du noyau arqué et du noyau paraventriculaire.

La ghréline, hormone orexigène, le jeûne ou l'hypoglycémie activent l'AMPK hypothalamique et favorisent la prise alimentaire. (Kahn et al., 2005)

#### **Insuline et mTORC1 au niveau hypothalamique:**

L'insuline active la voie PI3K/Akt hypothalamique, en particulier au niveau de l'ARC, pour exercer ses effets centraux sur la balance énergétique, favorisant la diminution de la prise alimentaire et du poids corporel et modulant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques (Belgardt et al., 2009). L'administration ICV d'insuline augmente la phosphorylation de S6 au niveau de l'ARC et du VMN, indépendamment de l'activité neuronale, comme le montre la mesure de l'expression de c-fos hypothalamique (Villanueva et al., 2009). De plus, l'insuline, comme la leptine, est capable d'inhiber l'activité AMPK au niveau de certains noyaux hypothalamiques dont le noyau arqué et le VMN (Minokoshi et al., 2004).

La voie mTORC1 hypothalamique est impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau hépatique (Ono et al., 2008). L'effet anorexigène de l'insuline au niveau hypothalamique implique probablement la voie mTORC1, mais le caractère mTOR-dépendant n'a pas encore été formellement prouvé (Haissaguerre et al., 2014).

#### **Leucine et mTORC1 au niveau hypothalamique :**

L'activité de mTORC1 n'est pas seulement régulée par les hormones, mais aussi par les nutriments dont les acides aminés. L'activation centrale de la voie mTORC1 par une injection ICV aigue de leucine entraine une diminution de la prise alimentaire associée à l'augmentation de la phosphorylation de S6K1 et S6 et l'inhibition de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus médiobasal (Blouet et al., 2008). La leucine ICV diminue l'expression de l'ARNm du NPY (Cota et al., 2006) et augmente l'expression de l'ARNm de POMC, la dépolarisation et l'expression de c-fos au niveau des neurones POMC de l'ARC (Ropelle et al., 2008). L'administration de leucine dans l'hypothalamus médiobasal entraine une diminution de la taille et du nombre des repas en recrutant des circuits neuronaux qui activent les neurones POMC du noyau arqué, les neurones à oxytocine du PVN et les neurone du tractus solitaire (Blouet et al., 2009). La rapamycine ICV est capable de bloquer l'effet anorexigène de la leucine (Cota et al., 2006).

#### **Activation physiologique de la voie mTORC1 hypothalamique :**

Lors du jeune (situation de faible disponibilité des substrats énergétiques, associés à une diminution de la leptine et l'insuline et à une augmentation de la ghréline), les niveaux de phosphorylation de mTORC1, S6K1 et S6 diminuent au niveau hypothalamique tandis que l'AMPK hypothalamique est au contraire activée.

Lors de la reprise alimentaire après un jeune (refeeding, situation associée à une augmentation de la disponibilité des nutriments, des acides aminés, du glucose, et d'augmentation de la leptine et de l'insuline), la voie de signalisation mTORC1 est activée alors que l'activité de l'AMPK est inhibée au niveau hypothalamique (Cota et al., 2006) (Minokoshi et al., 2004).

Ainsi, l'état d'activation de la voie mTORC1 hypothalamique dépend du statut énergétique de l'organisme et notamment de la disponibilité des nutriments.

#### **Ghréline et mTORC1 au niveau hypothalamique :**

L'administration ICV de ghréline entraine une augmentation de l'activité mTORC1 au niveau de l'ARC des rats non obèses. La ghréline induit la phosphorylation de S6 dans les neurones

AgRP/NPY, un phénomène associé avec l'activation neuronale (Villanueva et al., 2009) et à l'augmentation de la prise alimentaire. La rapamycine ICV bloque l'effet orexigène de la ghréline et l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'AgRP et du NPY induite par la ghréline (Martins et al., 2012). L'administration chronique périphérique de ghréline augmente le poids corporel et l'adiposité chez les souris S6K1-WT, mais pas chez les S6K1-KO (Stevanovic et al., 2013).

## **(ii) mTORC1 au niveau des neurones POMC**

Au niveau du noyau arqué, près de 90% des neurones NPY/AgRP et seulement 45% des neurones POMC expriment les formes phosphorylées (et donc activées) de mTOR et S6K1 (Cota et al., 2006). La leptine et l'insuline nécessitent l'intégrité de la voie PI3K/mTOR au niveau des neurones POMC et des neurones NPY/AgRP pour exercer leurs effets sur la prise alimentaire (Belgardt et al., 2009). Néanmoins, les connaissances sur l'implication de mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par les neurones POMC restent limitées.

SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), un inhibiteur potentiel des protéines STATs, est capable d'inhiber la voie Jak/STAT3 et la voie mTOR/S6K1/S6 au niveau hypothalamique (Reed et al., 2010). L'expression excessive de SOCS3 au niveau des neurones POMC, entraîne une altération de l'expression de phospho-STAT3 et de phospho-S6, induite par la leptine dans les neurones POMC, avec pour conséquence une résistance à l'effet anorexigène de la leptine, une obésité et une intolérance au glucose (Reed et al., 2010). Cette obésité n'est pas observée en cas d'activation excessive de SOCS3 au niveau des neurones hypothalamiques exprimant le récepteur à la leptine (POMC et NPY/AgRP). Ainsi, la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC est particulièrement impliquée dans l'effet anorexigène de la leptine.

Chez les souris âgées, la voie mTORC1 est hyperactivée au niveau des neurones POMC (Yang et al., 2012) par rapport aux souris jeunes. Cet excès d'activation de mTORC1 inhibe l'activité électrique des neurones POMC en activant des canaux potassiques ATP dépendants. L'administration de rapamycine par voie générale ou par voie ICV entraîne une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel et restaure l'excitabilité des neurones POMC chez les souris âgées (Yang et al., 2012). D'autre part, l'hyperactivité de la voie mTOR dans les



neurones POMC entraîne une augmentation de la taille du corps des neurones, une diminution des projections axonales vers le PVN et une hyperphagie menant à une obésité (Mori et al., 2009).

Au total, la voie mTORC1 constitue une des voies intracellulaires clés de régulation de l'activité des neurones du système mélanocortine. Les effets de l'activation de mTORC1 au niveau hypothalamique varient selon le signal périphérique (leptine, insuline ou ghréline), selon le statut nutritionnel (jeune ou satiété ; alimentation chow ou HFD), mais aussi selon la nature des neurones (POMC ou NPY/AgRP), la localisation (ARC ou VMN ou PVN), selon l'âge et aussi probablement selon la durée et l'intensité de l'activation (aigue ou chronique). Les mécanismes moléculaires exacts de la régulation de la balance énergétique induite par mTORC1 ne sont pas encore parfaitement connus, en particulier au niveau des neurones POMC.

## **2. Le rôle des ROS dans le métabolisme**

Les ROS régulent de nombreux processus physiologiques comme l'immunité et la régulation de la mort cellulaire. Ils semblent également impliqués dans la régulation physiologique du métabolisme énergétique. L'accumulation de ROS et l'apparition progressive de stress oxydant sont décrites lors du vieillissement, du diabète de type 2 et en cas d'obésité induite par l'alimentation.

### **a) Au niveau périphérique**

En conditions physiologiques, lorsque la glycémie augmente après un repas, une production pancréatique de ROSm est nécessaire à la sécrétion d'insuline sur des îlots fraîchement isolés. En cas de diabète, l'hyperglycémie chronique induit une augmentation de production des ROS mitochondriaux qui activent les voies de signalisation du stress cellulaire telles que NFkB (Nishikawa et al., 2000), MAPK et JNK (Ho et al., 2000), ce qui pourrait être impliqué dans le développement de l'insulino-résistance et favoriser le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas (Evans et al., 2003)

De la même manière, une augmentation modérée de ROS au niveau du tissu musculaire active des signaux intracellulaires clés comme PGC-1 $\alpha$ , AMPK et MAPK, qui contrôlent positivement l'adaptation musculaire et les enzymes anti-oxydantes. Une augmentation

excessive ou prolongée (supra-physiologique) des ROS entraîne des dommages oxydatifs fonctionnels sur les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les composants cellulaires (Barbieri and Sestili, 2012).

Lors du vieillissement, une perte de masse grasse et une accumulation de ROS apparaissent au niveau du tissu adipeux (Findeisen et al., 2011) et une augmentation des marqueurs de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des dommages ADN induits par les ROS sont observés au niveau du muscle squelettique (Barbieri and Sestili, 2012).

En cas d'obésité induite par l'alimentation (DIO), la production de ROS (Furukawa et al., 2004) et les marqueurs de la peroxydation lipidique (TBARS) (Findeisen et al., 2011) sont augmentés au niveau plasmatique et au niveau du tissu adipeux mais pas au niveau hépatique ou musculaire. L'augmentation de production de ROS au niveau des adipocytes est associée à une augmentation de l'expression de la NADPHoxydase et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes (Furukawa et al., 2004). L'administration d'un inhibiteur de la NADPH oxydase par voie orale réduit la production de ROS au niveau du tissu adipeux, atténue la dérégulation de adipocytokines et améliore le diabète, l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique.

Ainsi, la production des ROS semble augmenter avec l'âge et lors d'un régime riche en graisses au niveau des organes périphériques.

## **b) Au niveau central**

### **(i) Le rôle des ROS au niveau hypothalamique**

**Glucose ROS et hypothalamus :** Le métabolisme du glucose fournit des équivalents réduits qui cèdent leurs électrons au complexe I et II de la CRM lors de leur oxydation. Lors d'un apport rapide de substrats, leur oxydation provoque l'arrivée massive d'électrons sans régulation immédiate de la dissipation du gradient de protons par l'ATP synthase et/ou l'activité d'UCP. Ce temps d'adaptation de la CRM serait à l'origine d'une élévation transitoire de la production de ROSm.

L'injection ponctuelle/aigue de glucose par la carotide en direction du cerveau engendre chez le rat une augmentation de production des ROSm hypothalamiques, une augmentation de l'activité électrique globale de l'hypothalamus et une augmentation de l'activation neuronale

(c-fos) au niveau de l'ARC. Ces effets centraux sont associés à un pic de sécrétion d'insuline en périphérie. Le traitement par un piègeur de ROS bloque cet effet du glucose central sur l'activation neuronale du noyau arqué et sur l'insulinosécrétion. (Leloup et al., 2006).

Chez les rats Zucker obèses et insulino-résistants, une hypersensibilité hypothalamique au glucose est observée (Alquier et al., 2003) avec une augmentation de la production de ROSm en réponse au glucose ainsi qu'une surexpression de certains complexes de la CRM corrélée à une dysfonction de la respiration mitochondriale (Colombani et al., 2009). La perfusion ICV de glutathion peut corriger ce déséquilibre redox et restaurer une réponse normale à une hyperglycémie cérébrale (Colombani et al., 2009). Ainsi la production des ROSm est impliquée dans la régulation hypothalamique induite par le glucose.

**Lipides ROS et hypothalamus :** Une augmentation de 32% des ROS hypothalamiques, rapide et ponctuelle, est observée 30mn à 2h après une hypertriglycémie aigue ICV (Intralipid), se normalisant à 4h. Cet effet est associé à une augmentation de la consommation en O<sub>2</sub> hypothalamique de 15% et une diminution de la prise alimentaire 2 à 4h après l'injection (Benani et al., 2007). Cette augmentation de ROS n'est pas associée à une augmentation du stress oxydant, mesuré par le niveau de peroxydation lipidique. L'inhibition de la production de ROS par un piègeur de ROS (Glutathione ethyl ester), bloque l'augmentation des ROS hypothalamiques et la diminution de la prise alimentaire induites par l'Intralipid (Benani et al., 2007). La production hypothalamique de ROSm paraît donc indispensable au signal satiétogène d'une hypertriglycémie.

**Insuline ROS et hypothalamus :** L'administration ICV d'insuline entraîne une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de 36% des ROS hypothalamiques. La co-administration d'insuline ICV avec un anti-oxydant (Trolox) bloque à la fois l'augmentation des ROS hypothalamiques et la diminution de la prise alimentaire. En cas de jeune ou d'alimentation HFD chronique, l'insuline n'a plus d'effet sur les ROS hypothalamiques et sur la prise alimentaire des souris, en raison d'une augmentation des systèmes antioxydants hypothalamiques dans ces conditions là. Ainsi, l'effet anorexigène de l'insuline ICV nécessite une augmentation hypothalamique des ROS (Jaillard et al., 2009).

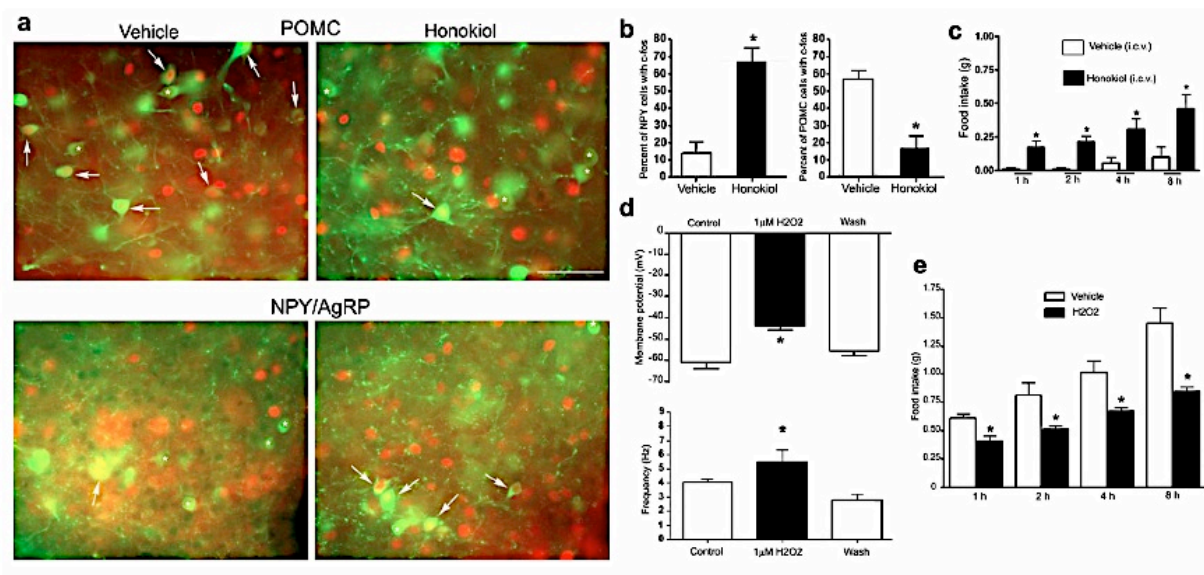
**Jeune ROS et hypothalamus :** En cas de jeune, une diminution de l'expression des ROS est décrite au niveau des neurones POMC (Diano et al., 2011). Or, en situation de jeune, l'

hypertriglycémie aigue (Intralipid IP) ou l'insuline ICV ne sont plus capables d'induire une augmentation des ROS hypothalamiques et une diminution de la prise alimentaire.

## (ii) Rôle des ROS au niveau des neurones de l'ARC

### Les ROS activent les neurones POMC et exercent un effet anorexigène (Figure 15)

L'expression des ROS au niveau des neurones POMC diminue chez les souris de poids normal après un jeûne de 12h. Chez des souris nourries avec une alimentation standard, l'administration centrale ICV aigue et ponctuelle d'un piègeur de ROS (honokiol) entraîne une diminution de l'expression de c-fos dans les neurones POMC et une augmentation significative de la prise alimentaire, suggérant une inhibition de l'activation neuronale POMC. Au contraire, l'administration centrale ICV aigue et ponctuelle d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une diminution de la prise alimentaire chez les souris privées de nourriture depuis 24h ainsi qu'une dépolarisation et une augmentation de l'activité électrique des neurones POMC. Les ROS pourraient constituer des régulateurs physiologiques de l'activité des neurones anorexigènes POMC.



**Figure 15. Les ROS modulent la prise alimentaire et l'activité neuronale des neurones POMC et NPY/AgRP au niveau de l'ARC. (Diano et al., 2011)**

**a et b.** L'honokiol ICV, un piègeur de ROS, entraîne une augmentation de l'expression de c-fos, marqueur d'activation neuronale, au niveau des neurones NPY et une diminution de son expression au niveau des neurones POMC.

**c.** L'honokiol ICV diminue la prise alimentaire des souris.

**d.** L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente la dépolarisation des neurones POMC-YFP de l'ARC.

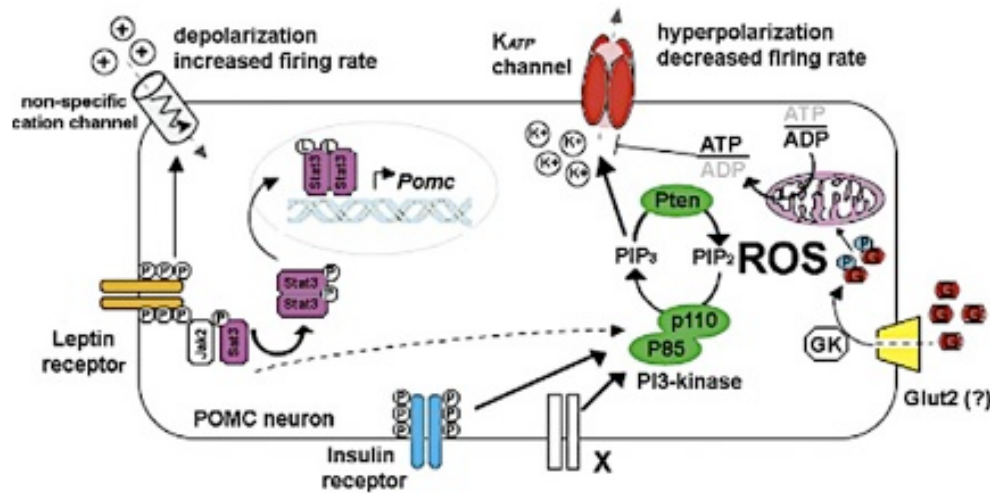
**e.** L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV augmente la prise alimentaire des souris.

Paradoxalement, chez les souris obèses (DIO), l'expression des ROS au niveau des neurones POMC est comparable à celles des souris minces avec accès libre à la nourriture. Il n'y a donc pas d'augmentation des ROS au niveau des neurones POMC en cas d'obésité. On peut donc émettre l'hypothèse que ce défaut d'augmentation des ROS puisse entraîner une diminution de l'activité neuronale des neurones POMC et donc une perte de l'inhibition de la prise alimentaire participant ainsi à la physiopathologie de l'obésité (Nasrallah and Horvath, 2014).

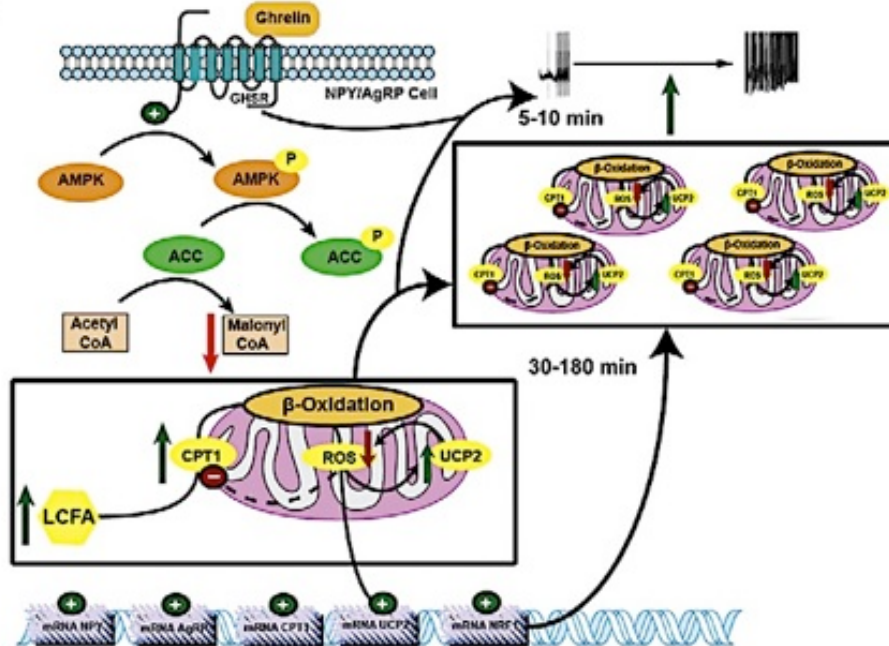
**Les neurones POMC qui utilisent le glucose comme source d'ATP ont une production mitochondriale accrue de ROS par rapport aux neurones NPY/AgRP (Figure 16)**

L'utilisation différentielle des sources d'énergie comme le glucose ou les acides gras est responsable des réponses distinctes des neurones NPY/AgRP et POMC aux signaux métaboliques. Les neurones POMC utilisent préférentiellement le glucose (Ibrahim et al., 2003) (Wang et al., 2004) comme source énergétique alors que les neurones NPY AgRP utilisent plutôt les acides gras (Andrews et al., 2008). Cette utilisation différentielle des sources énergétiques met en évidence 2 mécanismes énergétiques distincts au sein des neurones de l'ARC : la glycolyse et la  $\beta$  oxydation. Lorsque la  $\beta$  oxydation est élevée, la glycolyse est inhibée et réciproquement. Dans les neurones NPY/AgRP, la  $\beta$  oxydation des acides gras entraîne une production de ROS (Andrews et al., 2005a) qui est limitée et réduite par l'UCP2 (Andrews et al., 2008). Lors du jeune, la ghréline active l'AMPK et inhibe l'ACC ce qui permet l'oxydation des acides gras à longue chaîne et l'activation de l'UCP2 (Andrews et al., 2005a). Les neurones POMC sensibles au glucose semblent produire davantage de ROS par l'oxydation du glucose que les neurones NPY/AgRP lors de l'oxydation des acides gras (Parton et al., 2007). En cas d'obésité, la sensibilité des neurones POMC au glucose semble altérée selon un mécanisme impliquant UCP2 (Parton et al., 2007).

A



B



**Figure 16. L'utilisation différentielle des sources d'énergie (glucose ou acides gras) par les neurones POMC et NPY/AgRP modifie la régulation des ROS au niveau cellulaire.**

(A) : L'activation des neurones POMC est associée à une augmentation de la production mitochondriale de ROS liée au métabolisme du glucose.

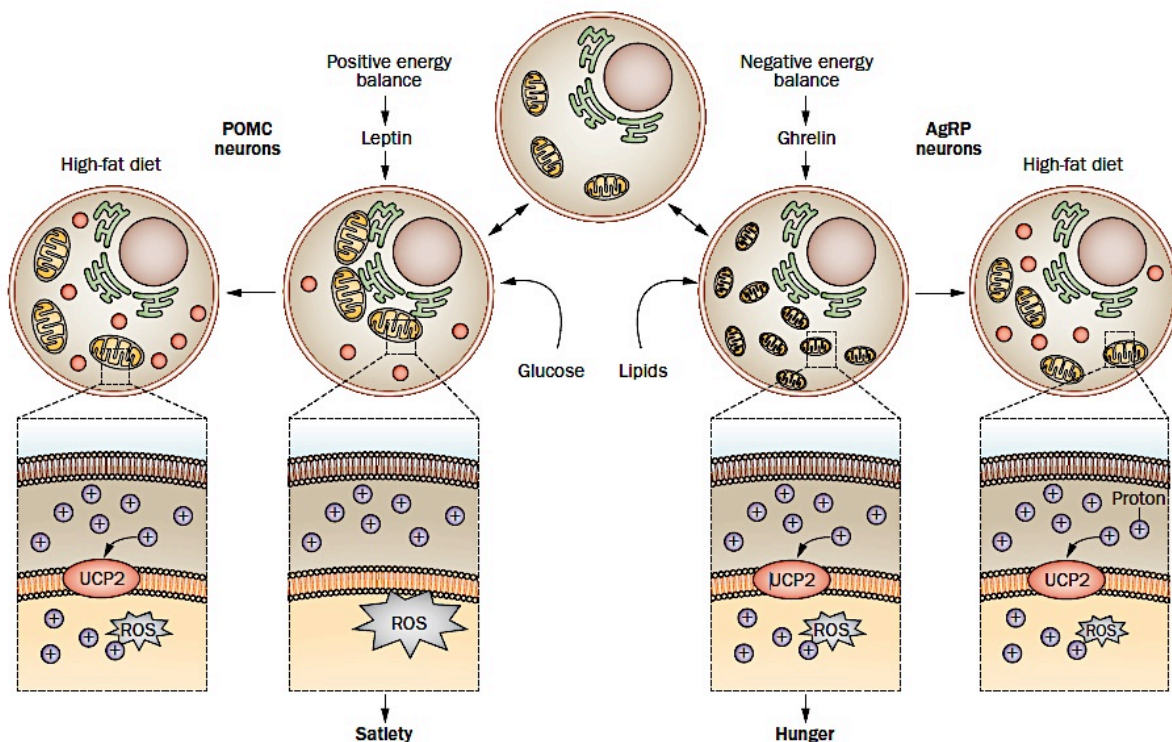
(B) : L'activation des neurones NPY/AgRP est associée à une augmentation de la  $\beta$  - oxydation des acides gras et à une production de ROS qui est rapidement contrôlée par l'UCP2 dont la transcription est favorisée par les acides gras. (Horvath et al., 2009)

En conditions physiologiques, la satiété est associée à une augmentation de production des ROS hypothalamiques et plus spécifiquement au niveau des neurones POMC. Horvath et al. suggèrent que les neurones POMC pourraient être plus exposés aux dommages induits par les ROS par rapport aux neurones NPY/AgRP qui contrôlent mieux la production de ROS en cas d'activation neuronale. Des études ont montré l'impact protecteur de l'UCP2 sur la mort cellulaire neuronale induite par les ROS (Diano et al., 2003) (Andrews et al., 2005b). La régulation et la stabilité des ROS induites par UCP 2 dans les neurones NPY AgRP pourraient participer à l'absence d'altération de fonction des neurones NPY AgRP au cours du temps ou en cas d'obésité (Andrews et al., 2005b) (Horvath et al., 2009). Lors du vieillissement ou lors d'un régime HFD au long cours, les neurones POMC pourraient s'altérer ce qui expliquerait la prise de poids observée avec l'âge ou en cas de régime riche en graisses au long cours (Chapman, 2008).

### **Leptine et ROS au niveau des neurones POMC (Figure 17)**

Les mécanismes neurobiologiques qui expliquent la résistance à la leptine observée chez les patients obèses (perte de capacité de la leptine à inhiber la prise alimentaire et la prise pondérale) sont mal connus (Halaas et al., 1997). La résistance à la leptine pourrait être la conséquence d'une altération de l'activation des neurones anorexigènes POMC et de certaines voies de signalisation intracellulaires impliquant notamment la voie Jak/STAT, les MAPK et la voie mTOR (STAT3 et SOCS3) (Heldsinger et al., 2014) (Wautman and Tavernier, 2011) (Bjørbaek et al., 1998).





**Figure 17. Effets du statut métabolique sur le métabolisme mitochondrial et la production de ROS au niveau des neurones POMC et NPY/AgRP en conditions physiologiques et lors d'un régime riche en graisses au long cours.**

(modèle proposé par Nasrallah and Horvath, 2014)

L'activité électrique et l'effet anorexigène des neurones POMC sont associés avec l'utilisation du glucose comme substrat énergétique et une augmentation de la production des ROS au niveau mitochondrial.

L'activité des neurones NPY/AgRP est associée à l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique et à une stabilité de production des ROSm.

L'exposition à un régime HFD augmenterait la prolifération des peroxysomes et l'activité de l'UCP2, favorisant le découplage et la diminution des niveaux de ROS dans les neurones POMC et NPY/AgRP.

Une corrélation est retrouvée entre les concentrations plasmatiques de leptine et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris minces après un jeûne de 12h. Chez les souris ob/ob, obèses et déficientes en leptine, l'expression des ROS au niveau des neurones POMC est identique à celle des souris minces en état de jeûne, un état associé avec des concentrations plasmatiques de leptine basses. Chez les souris rendues obèses par un régime HFD (DIO), il existe une augmentation de la leptinémie par rapport aux souris nourries avec une alimentation standard alors que l'expression des ROS est comparable au niveau des neurones POMC quelque que soit le poids et le type d'alimentation.



Cette perte de corrélation entre la leptinémie et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC pourrait s'intégrer dans la résistance à la leptine décrite en cas de DIO et suggère un potentiel rôle des ROS dans l'effet de la leptine au niveau des neurones POMC.

### **3. Interactions connues entre mTORC1 et les ROS**

#### **a) La voie mTORC1 régule la respiration mitochondriale**

Outre son rôle dans la régulation de la balance énergétique, mTORC1 est essentiel au maintien de la fonction oxydative mitochondriale. La voie mTOR contrôle la transcription de nombreux gènes mitochondriaux (en particulier PGC-1 $\alpha$ ) et régule positivement l'activité mitochondriale (phosphorylation oxydative) (Schieke et al., 2006), notamment au niveau musculaire, adipeux et hépatique. Ces effets sont inhibés *in vitro* par un traitement ponctuel par rapamycine (Cunningham et al., 2007) qui favorise également une diminution de la consommation en oxygène.

Les souris S6K1-KO (avec altération constitutive et donc chronique de la protéine S6K1) présentent *in vivo* une augmentation de l'utilisation des acides gras (lipolyse) et la consommation totale en O<sub>2</sub> de 27% (Um et al., 2004). Elles sont plus minces (diminution du poids corporel) que les souris S6K1-WT, malgré une augmentation de la prise alimentaire quotidienne (de 17% lorsque la prise alimentaire est rapportée au poids corporel), y compris en cas de régime HFD. Ainsi les conséquences d'une inhibition de la voie mTORC1 sur le métabolisme mitochondrial semblent varier selon la durée du stimulus, de manière similaire à ce qui est observé lors de la régulation de la prise alimentaire.

Les cellules KO pour TSC2 (avec activation constitutive de mTOR) présentent une augmentation de l'expression des gènes mitochondriaux et de la consommation en O<sub>2</sub> au niveau du muscle squelettique alors qu'une diminution de l'expression de ces mêmes gènes est observée au niveau des cellules musculaires KO pour raptor ou mTOR, mais pas au niveau des cellules KO pour S6K1 (Cunningham et al., 2007). De plus, l'activité mTOR et plus précisément la formation du complexe raptor/mTOR sont hautement corrélées au métabolisme mitochondrial. Ces travaux suggèrent qu'au sein de la voie mTORC1, raptor et mTOR seraient particulièrement impliqués dans la régulation de l'activité mitochondriale (phosphorylation oxydative, découplage et consommation d'oxygène).

Par ailleurs, l'hyperactivité de la voie mTOR pourrait entraîner une augmentation de la biogénèse mitochondriale et une élévation des ROS au niveau de cellules souches hématopoïétiques (Chen et al., 2009).

Le lien entre la voie mTORC1 et les ROS reste néanmoins mal connu, en particulier dans le domaine de la balance énergétique.

#### **b) Les ROS sont également capables de moduler mTORC1**

Dans un modèle de cellules neuronales, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable d'induire l'apoptose en inhibant la phosphorylation de S6K1 et de 4<sup>E</sup>-BP1 induite par mTOR via l'activation de l'AMPK (Chen et al., 2010). Les ROS, dans certaines conditions, peuvent donc inhiber la voie mTORC1 en activant l'AMPK. A l'inverse, l'honokiol, un piègeur de ROS, est capable d'inhiber la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans des modèles cellulaires d'inflammation ou de cancers (Crane et al., 2009) (Kim and Cho, 2008).

Les ROS activent également la voie Akt/mTOR dans des modèles animaux avec un syndrome myélo-prolifératif selon un mécanisme impliquant FoxO3 (Yalcin et al., 2010).

Au total, dans certaines conditions pathologiques, les ROS semblent capables de moduler l'activité de la voie mTOR selon un mécanisme impliquant l'AMPK ou FoxO3.

## . POSITION DE LA PROBLEMATIQUE

L'hypothalamus régule la balance énergétique en intégrant au niveau central les signaux périphériques nutritionnels et hormonaux comme la leptine. Cette régulation fait intervenir les neurones anorexigènes POMC et les neurones orexigènes NPY/AgRP au niveau de l'ARC. Au niveau hypothalamique, la voie mTORC1 et les ROS sont capables de moduler la prise alimentaire, selon le statut énergétique de l'organisme.

Les travaux de Diano ont montré l'existence d'une corrélation positive entre la leptine, activateur potentiel de mTORC1 et les ROS au niveau des neurones POMC chez les souris non obèses et chez les souris ob/ob. Cette corrélation est perdue chez les souris obèses DIO, qui présentent une hyperleptinémie sans augmentation des ROS au niveau des neurones POMC (Diano et al., 2011). Cette perte de corrélation entre la leptinémie et les ROS au niveau des neurones POMC pourrait être impliquée dans l'obésité induite par l'alimentation.

Horvath et al. (Nasrallah and Horvath, 2014) ont proposé un modèle de régulation de l'activation des neurones NPY/AgRP et POMC par les ROS selon les disponibilités en nutriments (**Figure 16**). L'administration centrale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mimant une augmentation hypothalamique des ROS, induit une diminution de la prise alimentaire. Une étude a montré que la leptine était capable d'activer la production de ROS au niveau de cellules hypothalamiques (Palomba et al., 2015). L'effet anorexigène de la leptine pourrait donc impliquer une augmentation des ROS au niveau des neurones POMC.

Des études in vitro ont montré que l'oxydation du glucose est associée à une augmentation de l'activité mTORC1 (Dennis et al., 2001) tandis que l'administration de rapamycine inhibe l'oxydation du glucose et favorise l'oxydation des acides gras (Sipula et al., 2006). Les neurones POMC utilisent principalement l'oxydation du glucose comme source d'ATP et donc de production de ROS par le biais de la phosphorylation oxydative mitochondriale. L'implication exacte de la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC est mal connue. L'action anorexigène de la leptine nécessite une activation de la voie mTORC1 au niveau de l'hypothalamus (Cota et al., 2006). Mais quels sont les effets de la leptine sur la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC ? Est-il possible que la leptine module à la fois l'expression des ROS et l'activation de la voie mTORC1 au niveau des cellules à POMC pour exercer son effet anorexigène ?

## . OBJECTIFS

Notre objectif principal était de décrire par une approche intégrative comment les espèces réactives dérivées de l'oxygène pourraient être impliquées dans la régulation physiologique de la prise alimentaire au niveau hypothalamique.

Pour cela, nous avons d'abord étudié les effets de la modulation hypothalamique/centrale ponctuelle/aigue des ROS sur la prise alimentaire, l'activation (c-fos) des neurones de l'ARC et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.

Compte tenu de l'ensemble des éléments évoqués précédemment, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre les ROS et la voie mTORC1 au niveau hypothalamique dans la régulation de la prise alimentaire.

Dans cet objectif, nous avons d'abord étudié les effets de l'administration centrale ponctuelle d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS) sur l'activation de la voie mTORC1 au niveau hypothalamique, puis au niveau des neurones POMC. Nous avons également étudié les effets de la modulation centrale aigue des ROS sur la prise alimentaire en cas d'altération génétique (souris S6K1-KO et -WT) ou pharmacologique (co-traitement avec de la rapamycine ICV) de la voie mTORC1. Finalement, nous avons étudié les conséquences d'une augmentation aigue/ponctuelle de ROS hypothalamiques sur la prise alimentaire et sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC en utilisant un modèle de souris avec une altération de la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC (souris POMC-raptor-KO).

L'existence d'une interaction entre la voie mTORC1 et les ROS hypothalamiques pose la question de l'implication potentielle des ROS hypothalamiques dans l'effet anorexigène central de la leptine, activateur de mTORC1.

Pour répondre à cette question, nous avons d'abord étudié les effets de la co-administration d'un piègeur de ROS et de leptine sur la prise alimentaire. Nous avons aussi mesuré l'effet de la leptine ICV sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.

Dans un second temps, nous avons administré de la leptine ICV chez des souris POMC-raptor-KO et -WT. Les effets sur la prise alimentaire et sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC ont été analysés.

Enfin, nous avons également étudié l'impact de la leptine ICV sur la consommation hypothalamique en O<sub>2</sub>.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Modèle animal

Toutes les expériences ont été menées dans le strict respect des recommandations de l'union européenne (2010/63/UE) et approuvées par le comité d'éthique CEEA50 à Bordeaux (autorisation n°01850.01). Tous les efforts ont été réalisés afin de limiter les souffrances et le nombre d'animaux utilisés. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est précisé entre parenthèses dans les légendes des figures.

Différents modèles génétiques de souris ont été utilisés dans le cadre de cette étude.

### a) C57Bl6J

Des souris mâles C57Bl6J de chez Janvier (Janvier Labs, 53941 Saint-Berthevin, France) ont été utilisées pour la majorité des études pharmacologiques, sauf précision contraire.

### b) S6K1 WT ou KO

Des souris S6K1 WT (wild-type pour phénotype sauvage) et KO (knockout pour phénotype muté), générées au Neurocentre Magendie ont aussi été utilisées. Les souches de souris S6K1-KO (Shima et al., 1998) (Um et al., 2004), fournies par les Dr. S. Kozma et Dr. G. Thomas (Université de Cincinnati et IDIBELL, Barcelone, Espagne), ont été croisées au moins 2 fois avec les souris C57Bl6/J dès leur arrivée au Neurocentre Magendie, Bordeaux, France, avant d'être maintenues grâce à un élevage hétérozygote.

Le gène de la protéine kinase ribosomale S6 (S6K1) a été interrompu par recombinaison homologe après remplacement de la séquence génomique de 1,2 kb contenant les sous-domaines catalytiques très conservés VIII-X de la sérine-thréonine kinase, par une cassette de résistance à la néomycine.

Ainsi, l'absence de la protéine S6K1 entraîne une altération ubiquitaire de la voie mTORC1 responsable d'une diminution de son activité chez ces animaux.

### c) POMC-raptor-WT et -KO

Les souris POMC-Raptor WT et KO ont également été générées au Neurocentre Magendie. Ces souris présentent une délétion spécifique de l'exon 6 du gène Raptor au niveau des

cellules POMC exprimant la cre-recombinase (Cre<sup>+</sup>). Elles résultent de l'accouplement de souris Raptor flox avec des souris exprimant la cre-recombinase dans les cellules POMC. La disponibilité et le nombre d'animaux étaient limités compte tenu du caractère récent de leur génération.

- Les souris Raptor flox ont été obtenues auprès de Jackson Labs (catalogue # 013188). Ces souris mutées possèdent des sites loxP flanquant l'exon 6 du gène cible Raptor (regulatory associated protein of mTORC1, protéine dont l'intégrité est nécessaire à l'activité mTORC1). Les souris homozygotes pour cet allèle sont viables, fertiles, normales en taille et sans anomalie ou malformation physique ou comportementale.
- Les souris POMC-cre ont été obtenues auprès de Jackson Labs (catalogue # 005965). L'activité cre a été prouvée au niveau des neurones impliqués dans la prise alimentaire (noyau arqué hypothalamique et noyau du tractus solitaire). Ces souris ont été accouplées avec des souris contenant un site loxP flanquant la séquence génomique englobant le codon stop du gène POMC1 de souris, entraînant une délétion des 30 premières paires de bases du gène POMC1. Ces souris ont ensuite été maintenues avec un fond mixte FVB/N, C57BL6J et 129. Lorsque les souris POMC-Cre sont accouplées avec des souris Raptor-flox, leur descendance exprime une délétion de l'exon 6 du gène Raptor spécifiquement au niveau des neurones POMC.

Ainsi les souris raptor-POMC-KO présentent une invalidation sélective du gène raptor et donc une altération de la voie mTORC1, sélectivement au niveau des neurones POMC.

#### **d) POMC Rosy**

Les souris POMC Rosy ou POMC-YFP ont également été générées au Neurocentre Magendie. Pour obtenir cette souche, des souris POMC-cre (ci dessus) ont été accouplées avec des souris YFP-rosy (YFP suivi par une séquence stop floxée). La délétion induite par la cre recombinaise au niveau de la cassette floxée stop entraîne l'expression de YFP dans les neurones POMC exprimant la cre.

Ainsi ces souris expriment une fluorescence spontanée YFP au niveau des neurones POMC.

Quel que soit le modèle utilisé, les souris étaient âgées de 7 semaines et hébergées en cages individuelles, dans une animalerie thermo-régulée à 22°C ± 2°C, avec un cycle jour/nuit décyclé 12h/12h (début de la phase diurne à 1h du matin et de la phase nocturne à 13h).

Les animaux ont eu un accès *ad libitum* à l'eau et nourris avec un régime standard pour rongeurs (Standard Rodent Diet A03, 3.2kcal/g, SAFE, France) contenant 5,9 % de lipides, 21% de protéines et 53% de glucides.

Pendant l'étude, la prise alimentaire et le poids corporel ont été mesurés quotidiennement dans la même pièce avec la même balance.

A la fin de l'étude, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale ou par perfusion intracardiaque après anesthésie au pentobarbital afin de recueillir les tissus pour des études neuro-anatomiques complémentaires.

## **2. Neurochirurgie**

Les souris ont été anesthésiées avec de la Ketamine et de la Xylazine (0,01 mL/g/souris d'un mélange comprenant 2 mL de Ketamine 5%, 0,5 mL de Xylazine 2% et 7,5 mL de NaCl 0,9%) et ont reçu une dose antalgique de buprénorphine (0,3 mg/mL ; 0,1 mL/souris ; Axience).

A l'aide d'un appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments, USA), une canule a été implantée dans le ventricule latéral de chaque souris (Antéro-postérieur -0.5mm à partir du bregma, Latéral -1.2mm et Dorso-ventral -2.1mm en profondeur), comme décrit par Bellocchio et al. (Bellocchio et al., 2013).

Le placement correct de la canule a été vérifié, après une période de récupération de 7 jours, en administrant 5 µg d'un composé orexigène, le neuropeptide Y (NPY) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., France) dans 1 µL de PBS (Phosphate Buffered Saline) par voie intra-cérébro-ventriculaire (ICV). Les souris ayant mangé moins de 0,5 g de nourriture 2 heures après l'administration de NPY ont été exclues de l'étude. Le pourcentage d'échec au test au NPY était de moins de 5%.

En cas de complication postopératoire (cachexie ou trouble du métabolisme associé à une balance énergétique négative, une perte de poids, de masse grasse et de masse musculaire, favorisé par un cancer ou une maladie grave et associé à un état de dénutrition, infection, perte de 20% du poids corporel ou autre critère conformément aux règles éthiques d'expérimentation animale, directive 2010/63/UE), l'animal a été sacrifié par dislocation cervicale.

### **3. Outils pharmacologiques**

#### **a) Modulateurs de ROS**

##### **(i) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été préparée à partir d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma-Aldrich inc., MO, USA) diluée dans une solution de NaCl afin d'obtenir une concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 μM, active sur la prise alimentaire.

Pour étudier l'effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur la prise alimentaire et le poids corporel des souris C57Bl6J, S6K1-WT ou -KO et POMC-raptor-cre- ou -cre+, l'injection ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 μM 2 μL/souris ou de son véhicule (NaCl) a été réalisée après une privation de nourriture de 24h, juste avant le début de la phase nocturne (13h). La prise alimentaire et le poids corporel ont ensuite été mesurés pendant les 24h suivant l'injection.

##### **(ii) Honokiol**

L'honokiol (catalogue # H4914, Sigma Aldrich) est une petite molécule polyphénol isolée à partir du gène Magnolia qui est capable de bloquer les ROS prévient la formation des radicaux hydroxyl, superoxide and peroxy (Dikalov et al., 2008).

L'honokiol a d'abord été dissous dans une solution d'éthanol 100%, puis secondairement dans une solution d'Intralipid à 20% (catalogue # I141, Sigma Aldrich) selon le protocole décrit dans (Diano et al., 2011) afin d'obtenir une solution mère d'honokiol à 37,6 mM.

Pour étudier l'effet de l'honokiol ICV sur la prise alimentaire et le poids corporel des souris C57Bl6J et S6K1-WT ou -KO, l'injection ICV d'honokiol à 376 μM (2 μL/souris) ou de son véhicule (solution mère d'éthanol diluée dans de l'Intralipid ou DMSO) a été réalisée en phase diurne (9h, soit 4h avant la survenue de la phase nocturne) sans privation de nourriture préalable. La prise alimentaire et le poids corporel ont ensuite été mesurés pendant les 24h suivant l'injection.



## **b) Modulateurs de mTORC1**

### **(i) Leptine**

La leptine recombinante de souris a été fournie par le Dr A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA) et diluée dans du PBS. L'effet anorexigène de la leptine IP ou ICV est reconnu aux concentrations de 2,5 mg/kg par voie IP (0,1 mL/30g souris) et 2,5 µg/µL ICV (1 µL /souris) (Nonogaki Nature 1998 ; Hulsey Physiol Behav 1998).

Pour étudier l'effet de la leptine ICV (dose anorexigène 2,5 µg/uL) ou IP (2,5 mg/kg) sur la prise alimentaire et le poids corporel des souris C57Bl6J, l'injection ICV (1µL/souris) ou IP (0,1 ml/souris) de leptine ou de son véhicule (PBS) a été réalisée en phase diurne (9h, soit 4h avant la survenue de la phase nocturne). La nourriture a été retirée 1h avant l'injection et réintroduite au moment de la phase nocturne comme décrit par (Cota et al., 2006). La prise alimentaire et le poids corporel ont ensuite été mesurés pendant les 24h suivant l'injection.

Pour évaluer les effets du blocage central des ROS par un piègeur de ROS, sur l'effet anorexigène de la leptine, une injection ICV d'Honokiol 376 µM (2µL/souris) ou de son véhicule a été réalisée immédiatement avant l'injection IP de Leptine 2,5 mg/kg (soit 0,1 ml/30g de souris) ou de PBS. Le traitement a été administré en phase diurne (à 9h du matin, 4h avant le passage à la phase nocturne). La nourriture a été retirée 1h avant les injections et réintroduite au moment de la phase nocturne comme décrit par (Cota et al., 2006). La prise alimentaire et le poids corporel ont ensuite été mesurés pendant les 24h suivant les injections.

### **(ii) Rapamycine**

La rapamycine a été fournie par Millipore (catalogue #553210). L'effet orexigène de la rapamycine ICV est connu à la dose de 25 µg/µL (données du laboratoire et publiées dans (Cota et al., 2006). Etant donné que nous recherchions une dose de rapamycine active au niveau moléculaire mais non active sur la prise alimentaire afin de bloquer la voie mTORC1, les concentrations suivantes ont été testées : 12 ; 18 et 25 µg/µL à raison d'1 µL par voie ICV dilué dans du DMSO pur.

Pour les études de prise alimentaire, la rapamycine est habituellement injectée en phase diurne, à 9h, soit 4h avant le début de la phase nocturne, chez des souris avec accès libre à la nourriture.

Pour étudier l'effet du blocage intracellulaire de la voie mTORC1 par la rapamycine sur l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la rapamycine (18 µg/µL ; 1 µL/souris) ou son véhicule (DMSO) a été injectée 40 mn après l'injection ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µM ; 2 µL/souris) ou son véhicule (NaCl), juste avant la phase nocturne, chez des souris C57Bl6J, privées de nourriture pendant 24h. La prise alimentaire et le poids corporel ont ensuite été mesurés pendant les 24h suivant l'injection de rapamycine ou de son véhicule.

#### **4. Etudes du comportement alimentaire**

Après l'administration aiguë d'un composé, la prise alimentaire a été évaluée 1h, 2h, 4h et 24h après l'injection IP ou ICV tandis que le poids corporel a été mesuré juste avant et 24h après l'injection IP ou ICV.

Les composés orexigènes ont été administrés durant la phase diurne, où les souris ne s'alimentent pas, afin de mettre en évidence l'effet potentiel sur la prise alimentaire. Pour les mêmes raisons, les composés anorexigènes ont été administrés juste avant la phase nocturne, phase principale d'alimentation pour les souris, après une période donnée de privation de nourriture (24h pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 5h pour la leptine), conformément au protocole décrits respectueusement par (Diano et al., 2011) et (Cota et al. 2006).

#### **5. Analyse de l'expression des ROS dans les neurones POMC : mise au point d'une technique de quantification du signal des ROS au niveau des neurones anorexigènes POMC**

##### **a) Le dihydroéthidium (DHE)**

Le DHE est un composé capable de traverser les membranes qui, en présence de ROS, et plus particulièrement de superoxide, produit du 2-hydroxyéthidium, un composé fluorescent rouge pouvant être détecté en microscopie à fluorescence (pic d'excitation entre 350 et 400nm - pic d'émission entre 518 et 605nm (Wang et al., 2013).

Pour étudier l'effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur l'expression des ROS au niveau des neurones anorexigènes POMC chez des souris C57Bl6J ou POMC-raptor-WT et -KO, une injection IP de 0,2mL de DHE pour une souris de poids moyen 27gr (Sigma-Aldrich Chimie Sarl, 38297 St Quentin Fallavier, France) 1mg/mL a été réalisée, à l'abri de la lumière, 45 min avant l'injection ICV de la drogue d'intérêt (leptine 2,5 µg/µL ou son véhicule PBS 1 µL/souris; ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 µM ou son véhicule NaCl ; 2 µL/souris). Puis, 15 à 20 min plus tard, les souris ont été anesthésiées avec du pentobarbital (0,1mL/souris, pentobarbital sodique 54,7mg/mL, Ceva Santé Animale, France), perfusées avec du PBS 1X (pH 7,4) pendant 4 min, puis du paraformaldéhyde à 4% (PFA ; Aldrich chemistry, USA) pendant 8 min. Les cerveaux ont été prélevés et conservés pendant 24h dans du PFA 4% à 4°C, puis transférés dans une solution de sucrose 30% pendant 48h à visée cryoconservatrice. Des coupes flottantes de 30µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 500M, Microm Microtech, Francheville, France) avant d'être conservées à -20°C dans une solution cryoprotectrice (30% d'éthylène glycol, 30% de glycérol et PBS), jusqu'à leur utilisation pour des études neuroanatomiques.

#### **b) Immunofluorescence POMC**

Après plusieurs lavages dans du PBS 1X et une incubation d'une heure dans une solution de saturation (contenant du normal goat serum à 10%, du Triton à 0,3% dans du PBS), les coupes de cerveaux incluant l'hypothalamus ont été incubées une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-POMC (1/2000 ; anti rabbit POMC, catalogue # H023-30, Phoenix Pharmaceuticals). Après rinçage au PBS 1X, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire fluorescent (1/1000 ; anti rabbit Alexa Fluor 488, catalogue #4412, Cell Signaling). Puis, les coupes ont été montées sur lame dans un milieu de montage (Prolong® Gold antifade Reagent ; Molecular Probes ; Life technologies USA).

#### **c) Capture et analyse des images**

Le microscope Spinning Disk (Leica DMI 6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) a été utilisé pour visualiser et quantifier la fluorescence du DHE (signal sous forme de spots, en rouge, longueur d'onde 561nm) et pour localiser la fluorescence de l'anticorps anti-POMC (signal sous forme de cellules, en vert, longueur d'onde 491nm). Un minimum de 4 acquisitions par coupe et de 3 coupes par cerveau était analysé (60 à 120 photos par condition de traitement selon le nombre de souris). Les images obtenues ont été analysées avec le

logiciel ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) à l'aide d'une macro adaptée, créée par l'équipe du Bordeaux Imaging Center. L'autofluorescence était prise en compte lors du traitement des images. Les résultats sont exprimés sous forme de nombre de spots de DHE, de volume occupé par le DHE et d'intensité de spots de DHE par neurone POMC. Le volume moyen (en voxels) et l'intensité moyenne de fluorescence (en AU) des neurones POMC était comparable entre les souris traitées par véhicule ou par la drogue d'intérêt (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou leptine). Ces 2 derniers paramètres ont été évalués systématiquement et en cas de différence, le nombre de spots de DHE et le volume occupé par le DHE (en voxels) étaient rapportés au volume POMC (en voxels) et l'intensité des spots de DHE (en AU) à l'intensité POMC.

## **6. Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale hypothalamique**

L'oxygraphie permet de mesurer la consommation d'oxygène par seconde et par quantité de protéines hypothalamiques.

Pour évaluer la fonctionnalité de la respiration mitochondriale, plusieurs états de stimulation ou d'inhibition de la respiration ont été étudiés:

- **Etat 3:** le tissu hypothalamique est mis en présence d'un ou de plusieurs substrats permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire et d'ADP pour permettre l'activation de l'ATP-synthase. L'addition d'ADP induit une forte consommation d'oxygène dépendant de la force proton-motrice par l'ATP-synthase pour la phosphorylation de l'ADP.
- **Etat 4:** Cet état est obtenu par l'addition d'oligomycine, inhibiteur de l'ATP-synthase. La force proton-motrice ne peut donc plus être utilisée pour la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène est ralentie.
- **Etat découplé:** cet état correspond à l'état de respiration maximale de la chaîne respiratoire, mesuré en présence de FCCP [Carbonyl cyanide 4(trifluoromethoxy)phenylhydrazone], un protonophore qui découple totalement la phosphorylation oxydative.

La consommation d'oxygène hypothalamique a été mesurée par un oxygraphe (Oxygraph Plus System, Hansatech Instruments) à l'aide d'une électrode de Clark sensible à l'oxygène. Les mesures ont été réalisées à 37°C dans un tampon de respiration (milieu de respiration

mitochondriale Mir05 ; Oroboros ; Mitochondrial Physiology Network 8.5 de Andrey Kuznetsov).

Les solutions de Mir05, ADP, Malate, FCCP et oligomycine ont été conservées à -20°C selon les concentrations recommandées par Oroboros. Les solutions de saponine, de pyruvate ainsi que les drogues injectées ICV ont été préparées le jour de la mesure.

L'électrode a été préparée et calibrée la veille ou le matin de l'expérimentation.

Les souris ont été injectées par voie ICV selon les protocoles décrits ci-dessus pour chaque drogue étudiée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, après une privation de nourriture pendant 24h et administré juste avant la phase nocturne ; rapamycine, et leptine sans privation préalable de nourriture, administré durant la phase diurne, 4h avant la phase nocturne).

Puis, elles ont été sacrifiées 30 min après l'injection ICV par dislocation cervicale avec extraction et pesée de l'hypothalamus entier, conservé dans un eppendorf contenant 100 µL de solution tampon de Mir05.

L'hypothalamus a ensuite été transféré dans un eppendorf contenant 100 µL de solution tampon de Mir05 avec de la saponine (catalogue #S7900, Sigma-Aldrich) à 5 mg/ml (diluée dans de l'H<sub>2</sub>O mQ) et homogénisé à l'aide d'un tissue-lyser (Qiagen) pendant 2 min, avec 15 battements par seconde.

Puis, 20 µL de la solution contenant le tissu homogénisé a été placé dans l'électrode à 37°C avec 10 µL de malate (1,073 g/10ml H<sub>2</sub>O, Sigma M1000) et 10 µL de pyruvate (44 mg/0,2 ml H<sub>2</sub>O mQ; Sigma P2256). L'enregistrement de la consommation en oxygène de cette solution correspond à l'état 4 de la respiration mitochondriale.

Secondairement, 20 µL d'ADP (0,501 g/2ml H<sub>2</sub>O ; Sigma A 5285) a été ajouté dans la chambre de l'électrode à oxygène et un nouvel enregistrement de la consommation en oxygène a été réalisé, correspondant à l'état 3 de la respiration mitochondriale.

Puis, 1 µL d'oligomycine à 4mg / 1 ml (dilué dans de l'éthanol, Sigma 04876) a été ajouté dans la chambre, permettant ainsi d'étudier l'impact négatif du blocage de l'ATP synthase sur la respiration mitochondriale.

Enfin, 0,5 µL de FCCP (2,54 mg/10ml ethanol, sigma C2920), un protonophore, a été injecté une à 2 fois dans la chambre de l'électrode à oxygène.

Afin d'ajuster les mesures de consommation en oxygène du tissu, exprimées en nmol O<sub>2</sub>/mg/seconde, à la quantité de protéines extraites de l'hypothalamus, une quantification des

protéines à l'aide d'un kit BCA a été réalisée dans un second temps sur l'échantillon tissulaire conservé à -20°C.

## **7. Quantification de protéines**

Les échantillons sont dilués au 1/2 dans du tampon de lyse (RIPA Buffer catalogue #A1111 ; Santa Cruz Biotechnology). Leur concentration protéique est déterminée en utilisant le kit de dosage protéique (BCA Protein Assay Kit catalogue #23225 ; Pierce) selon le protocole en microplaques préconisé, les mélanges protéiques étant dilués au 1/40 dans le réactif (50 :1, réactif A:B). Le principe de ce dosage colorimétrique repose sur deux réactions. La première, appelée réaction du Biuret est la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^{+}$  par les protéines dans un environnement alcalin. La seconde est la formation d'un produit violet par réaction entre deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA) et une molécule d'ion  $\text{Cu}^{+}$ . L'absorbance de ce complexe coloré est mesurée à 562nm avec le Model 680 Microplate Reader® de Bio-Rad après 2h d'incubation à température ambiante.

## **8. Western blot**

Pour étudier l'effet de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ICV sur la phosphorylation hypothalamique de la protéine S6K1, des souris C57Bl6J ont été injectées avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ICV 2 $\mu\text{L}$ /souris à 5 $\mu\text{M}$  après une privation de nourriture de 24h, puis sacrifiées par dislocation cervicale 1h plus tard. Les hypothalami ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses par Western Blot.

Les hypothalami ont été homogénéisés dans un tampon RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les concentrations de protéines ainsi extraites ont été mesurées en utilisant un kit BCA conformément aux instructions (Pierce, Rockford, IL) et comme dans (Cota et al., 2006) (Binder et al., 2013).

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel 10% SDS/PAGE, puis transférées sur des membranes en nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été incubées pendant une heure à température ambiante dans une solution de saturation [(1X TBS (Tris-buffered saline), 0,1% Tween-20, 5% lait écrémé]. Enfin, les membranes ont été incubées une nuit à 4°C avec un anticorps primaire monoclonal anti- phospho-S6K1 (thr389 ; Millipore MABS82 1/1000) ou avec un anticorps primaire monoclonal anti- S6K1 (Millipore 04-391 1/1000). Après lavage au TBS/T, les membranes ont été incubées une heure à température ambiante avec un

anticorps secondaire fait chez la chèvre anti- souris (1/2000; catalogue #AP124P Millipore) et anti- lapin (1/2000; catalogue # 7074, Cell Signaling) respectivement. Afin de décrocher les anticorps spécifiques fixés sur la membrane, celle-ci a été incubée dans une solution contenant du 2-mercaptoethanol puis après lavage et saturation, incubée avec un nouvel anticorps primaire : lapin anti-  $\beta$ -actine (#4967S ; Cell Signaling Technology, 1/1000) ou anti- S6K1.

Les protéines ont été détectées en utilisant des réactifs chimioluminescents (kit Western lighting chemiluminescence reagent plus; PerkinElmer) et les membranes ont été exposées sur films radiographiques (Denville Scientific, South Plainfield, NJ). La quantification de l'expression des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

## **9. Immunohistochimie c-fos**

Pour étudier l'effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'expression de c-fos au niveau du noyau arqué, une injection ICV aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5  $\mu$ M ; 2  $\mu$ L/souris) ou de son véhicule (NaCl 0,9% ; 2  $\mu$ L/souris) a été réalisée, juste avant la phase nocturne, chez des souris C57Bl6J privées de nourriture depuis 24h. 1h après l'injection, les souris ont été anesthésiées avec du Pentobarbital (0,1mL/souris, pentobarbital sodique 54,7mg/mL, Ceva Santé Animale, France), perfusées avec du PBS 1X (pH 7,4) pendant 4 min, puis du Paraformaldéhyde à 4% (PFA ; Aldrich chemistry, USA) pendant 8 min. Les cerveaux ont été prélevés et conservés pendant 24h dans du PFA 4% à 4°C, puis transférés dans une solution de sucrose 30% pendant 48h à visée cryoconservatrice. Des coupes flottantes de 30 $\mu$ m ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 500M, Microm Microtech, Francheville, France) avant d'être conservées à - 20°C dans une solution cryoprotectrice (30% d'éthylène glycol, 30% de glycérol et PBS), jusqu'à leur utilisation pour des études neuroanatomiques.

Les coupes contenant l'hypothalamus ont été incubées une nuit à 4°C avec un anticorps primaire polyclonal anti-c-fos (dilution 1/1000 ; Santa Cruz référence sc-52). Après rinçages au PBS 1X, les coupes ont été incubées 2h avec un anticorps secondaire polyclonal anti-lapin conjugué à la biotine (dilution 1/1000; catalogue #E0432, Dako), puis dans une solution contenant un complexe avidine/biotine couplé à la peroxydase (Vectastain Elite ABS System, Vector Laboratories) pendant 1h30. Le marquage a été visualisé à l'aide d'une solution chromogène 3, 3'-diaminobenzidine ((DAB) Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Laboratories) après montage sur lame gélatinée et déshydratation des coupes. Les images ont

été obtenues à l'aide d'un microscope Leica DM4000 et le marquage a été quantifié automatiquement par le logiciel ImageJ.

## **10. Statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM (erreur type de la moyenne ou standard error of the mean). Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Statistica 9 (StatSoft). Pour comparer 2 groupes, un t-test non apparié a été réalisé et pour comparer plusieurs groupes, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée. Dans le cas des mesures répétées (prise alimentaire 1h à 24h), des tests ANOVAs à mesures répétées ont été utilisés, suivis par les tests post-hocs appropriés (LSD Fisher).

Une différence significative est définie par un  $p < 0,05$ .



## . **RESULTATS**

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre d'animaux est précisé entre parenthèses sur chaque figure. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

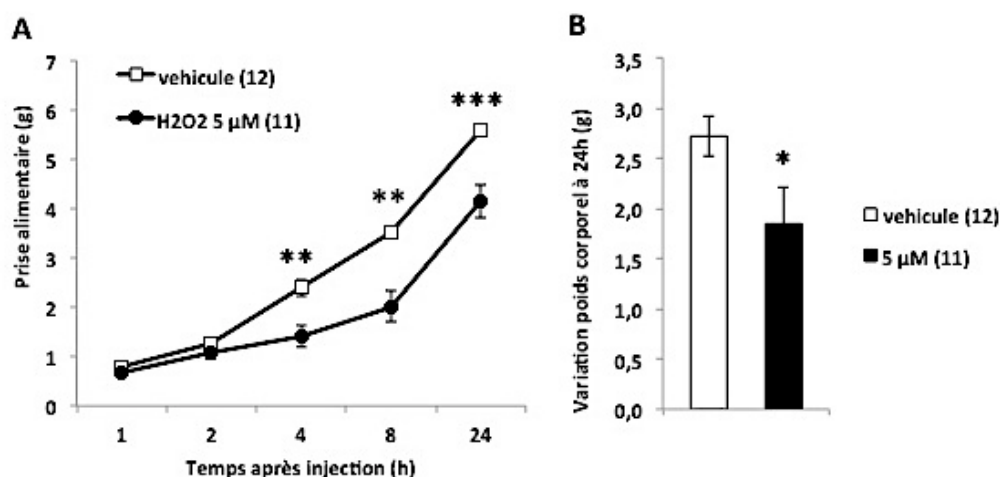
### **I. Le rôle des ROS dans la régulation de la prise alimentaire au niveau central**

Le premier objectif de ce travail était d'étudier les effets d'une modulation aiguë, ponctuelle des ROS au niveau du système nerveux central sur la régulation de la balance énergétique. Pour cela, nous avons injecté de l' $H_2O_2$ , un ROS, et de l'honokiol, un piègeur de ROS, par voie ICV à des souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard. Les effets de ce traitement sur la prise alimentaire et le poids corporel, sur c-fos, un marqueur d'activation neuronale, au niveau du noyau arqué et sur l'expression des ROS au niveau des neurones anorexigènes POMC ont été évalués.

#### **1. Effets de la modulation aiguë des ROS dans la régulation de la prise alimentaire**

##### **a) $H_2O_2$**

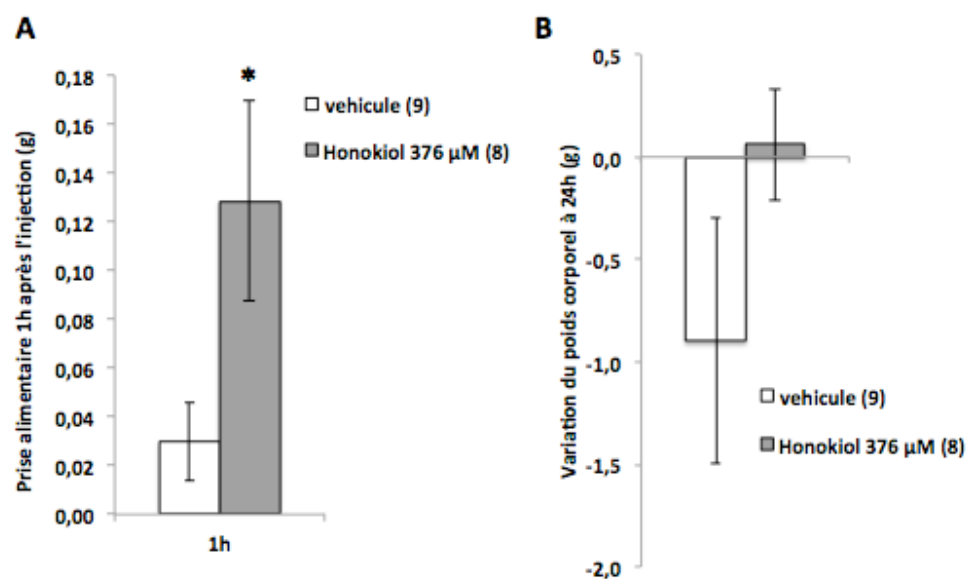
Les souris C57Bl6J ont été privées de nourriture pendant 24h. L' $H_2O_2$  (n=11) ou son véhicule (NaCl ; n=12) a été injecté par voie ICV, juste avant la phase nocturne (phase principale d'alimentation pour les rongeurs), à la dose de 2  $\mu$ L/souris à 5  $\mu$ M. L' $H_2O_2$  entraîne une diminution significative de la prise alimentaire 4h ( $p=0,0026$ ), 8h ( $p=0,0017$ ) et 24h ( $p=0,0003$ ) après l'injection (Anova mesures répétées  $p < 0,00001$  ; Effet temps/traitement  $p < 0,00001$  ; F 14,3), associée à une diminution significative du poids corporel 24h après l'injection ( $p=0,043$ ) par rapport aux souris traitées par véhicule (NaCl ; n=12). (**Figure 18**)



**Figure 18.** L'administration aiguë d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV (5μM) diminue la prise alimentaire (A) et le poids corporel (B) chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

### b) Honokiol

L'honokiol (piégeur de ROS) (n=9) ou son véhicule (n=8) a été injecté par voie ICV, en phase diurne, 4h avant le début de la phase nocturne, à la dose de 2 μL/souris à 367 μM chez les souris C57Bl6J. L'honokiol entraîne une augmentation significative de la prise alimentaire, 1h après l'injection (p=0,028) par rapport aux souris traitées par véhicule, mais n'a pas d'effet sur la prise alimentaire à 2h, 4h et 24h. (**Figure 19 A et B**)



**Figure 19.** L'administration aiguë d'honokiol ICV (376 μM) augmente la prise alimentaire 1h après l'injection (A), mais n'a pas d'effet sur le poids corporel à 24h (B) chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

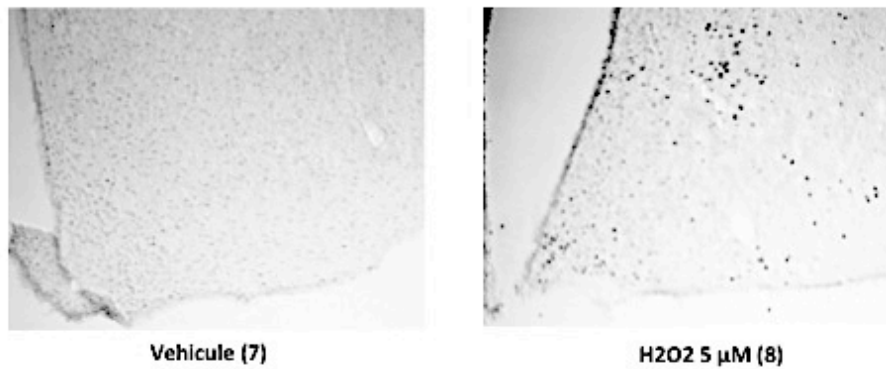
Ces résultats montrent qu'une augmentation aigue des ROS au niveau central favorise la diminution de la prise alimentaire et du poids corporel tandis qu'une inhibition aigue des ROS au niveau central entraine une augmentation ponctuelle de la prise alimentaire.

Nous avons ensuite cherché à préciser les populations neuronales impliquées dans cette modulation de la prise alimentaire par les ROS en étudiant d'abord l'effet d'une administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activation neuronale du noyau arqué, reflétée par le marqueur c-fos ; puis en étudiant l'effet d'un traitement aigue par ROS exogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV) sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, reflétée par le signal DHE.

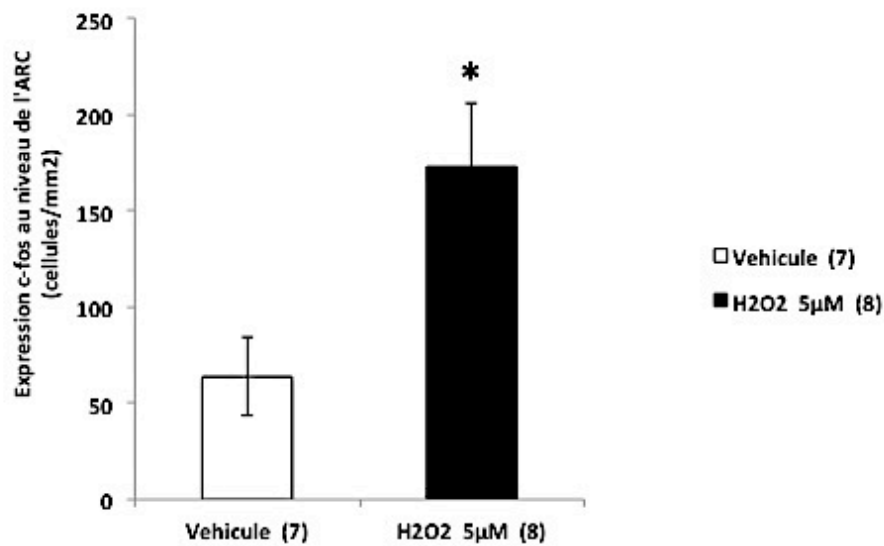
## **2. Effets de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur l'activation neuronale au niveau du noyau arqué**

Des souris C57Bl6J ont été privées de nourriture pendant 24h puis sacrifiées 1h après une injection ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=8) ou de son véhicule (NaCl ; n=7). c-fos a été choisi comme marqueur d'activation neuronale (Bullitt, 1990). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente de manière significative l'expression de c-fos, au niveau du noyau arqué hypothalamique, par rapport aux souris traitées par véhicule (NaCl ; n=7) ( $p < 0,03$ ). (**Figure 20 A et B**)

**A**



**B**



**Figure 20.**

L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV augmente l'expression de c-fos au niveau du noyau arqué hypothalamique chez les souris C57Bl6J par rapport aux souris traitées par véhicule (NaCl).

(A) Images représentatives du marquage c-fos au niveau de l'ARC.

(B) Quantification de l'expression de c-fos au niveau de l'ARC.

Ensuite, nous avons voulu étudier l'effet d'une administration exogène ICV de ROS sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.

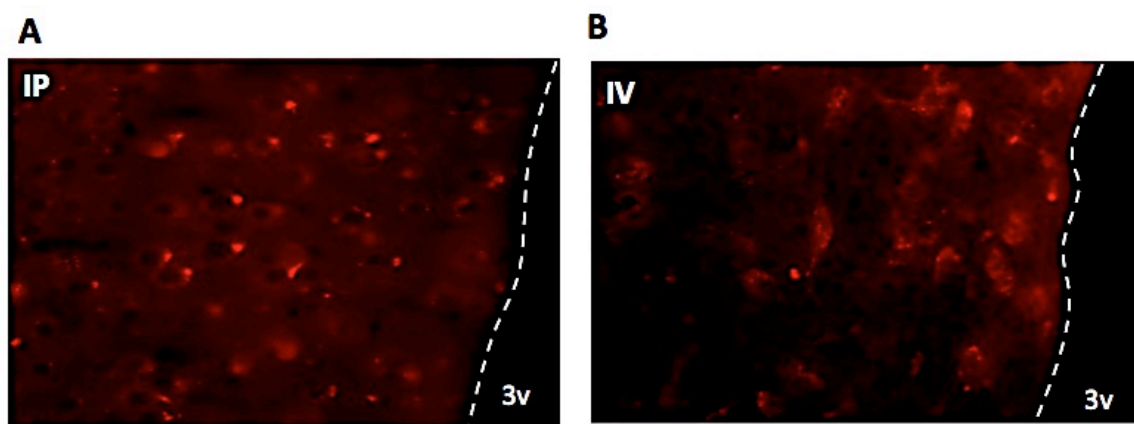
### 3. Effets de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC

Afin d'étudier les effets de l'administration ICV de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'expression des ROS au niveau hypothalamique et plus spécifiquement au niveau des neurones POMC, nous avons mis au point une technique semi-quantitative d'immunofluorescence.

Comme décrit dans la partie « matériels et méthodes », le dihydroéthidium ou DHE est un composé qui émet une fluorescence rouge en présence de ROS et donc sa quantification est un marqueur indirect de l'expression des ROS. Le signal du DHE est visible au microscope sous la forme de petits points (spots) cytoplasmiques.

Le DHE est particulièrement difficile à manipuler *in vivo* car il s'oxyde au contact de l'air et en raison de sa sensibilité à la lumière. Pour limiter l'oxydation du DHE, nous avons donc utilisé à chaque fois un nouveau flacon, ouvert immédiatement avant l'injection et dilué dans du DMSO anhydre.

Nous avons d'abord réalisé des tests préliminaires pour comparer les effets d'une injection IP ou IV (intraveineuse) de DHE au niveau de la queue des souris. Le DHE a initialement été testé chez des souris POMC-YFP, émettant une fluorescence verte au niveau des neurones POMC, en utilisant la même concentration utilisée par Diano et al. (1mg/ml). Nous avons montré que le mode d'administration IP ou IV ne modifie ni le type de marquage, ni l'intensité du signal DHE (**Figure 21**). De plus, l'injection IV est moins reproductible sur le plan technique que la voie IP (risque d'échec) et moins rapide car elle nécessite l'anesthésie des animaux à l'isoflurane 3%.



**Figure 21.**

Représentation de la fluorescence du DHE au niveau de l'ARC en cas d'administration IP (A) ou IV (B).

3v : 3<sup>ème</sup> ventricule

Après avoir réalisé cette étape de mise au point, nous avons réalisé une immunofluorescence POMC sur des coupes hypothalamiques des animaux afin de co-localiser le signal DHE et le signal POMC.

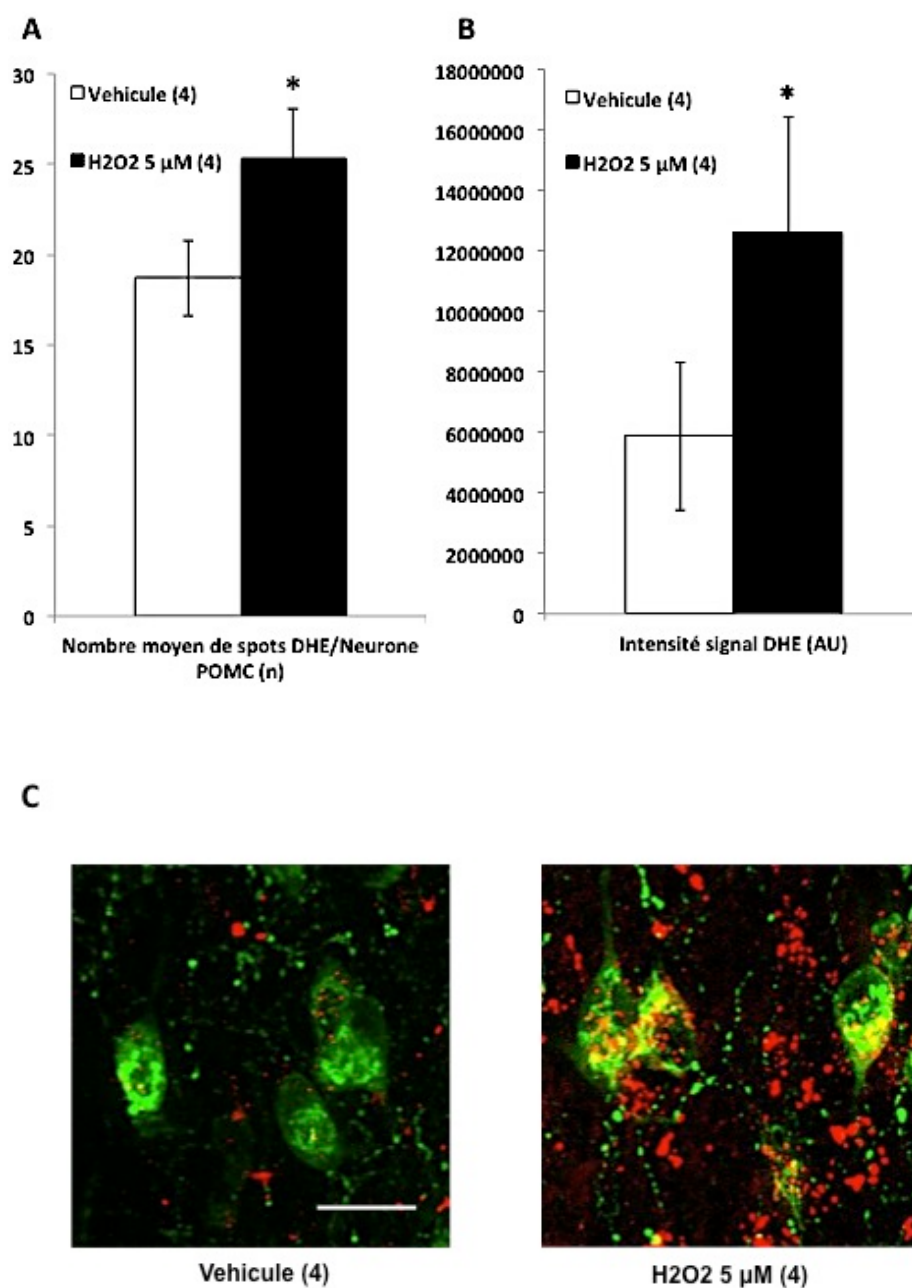
Afin de mesurer l'expression du DHE dans les neurones POMC nous avons utilisé un microscope confocal, puis un microscope à épifluorescence avec un grossissement de x63. Cependant, étant donné la faiblesse de l'intensité du DHE, cette approche s'est révélée peu performante. Nous avons donc finalement utilisé le microscope spinning disk en raison de ses performances supérieures en terme de résolution. Grâce à une collaboration avec l'équipe du Bordeaux Imaging Center, nous avons créé une « macro » pour étudier le type de signal induit par le DHE au niveau des neurones POMC, en tenant compte de l'autofluorescence observée au niveau de l'hypothalamus. Le nombre moyen de spots par neurone POMC (nombre de points rouges), l'intensité moyenne du signal fluorescent par neurone POMC (en AU) et le volume de spots par neurone POMC (en voxels) ont été mesurés.

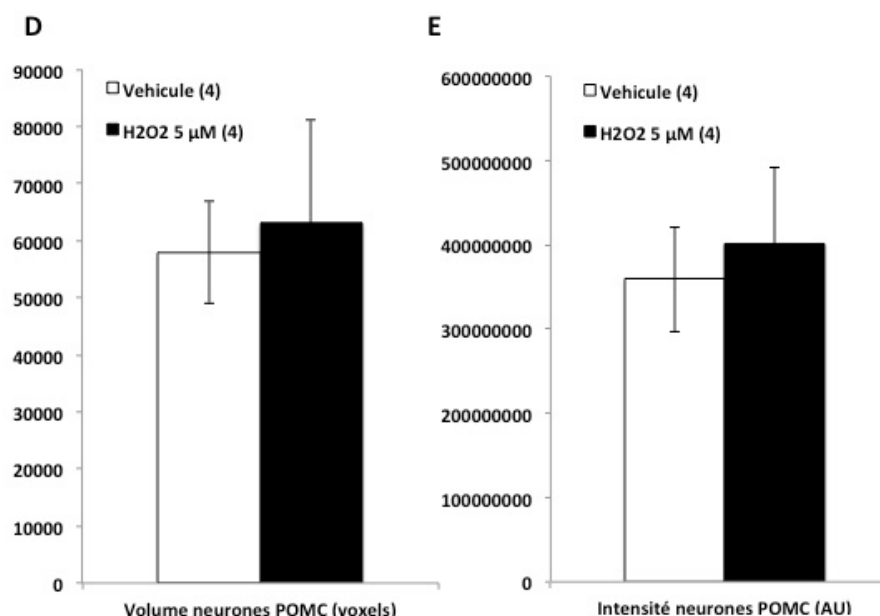
La procédure a d'abord été testée chez des souris POMC-YFP, puis chez des souris C57Bl6J, associée secondairement à une immunofluorescence simple POMC, afin de ne pas être limité par la disponibilité des animaux. Dans les 2 modèles, l'expression du DHE dans les neurones POMC était quantifiable par le logiciel ImageJ en utilisant la « macro » spécifique au DHE.

Après injection de DHE IP 0,2 ml/ souris à 1 mg/ml, puis administration ICV de 2 uL/souris d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 µM (n=4) ou de son véhicule (NaCl ; n=4), les souris C57Bl6J ont été sacrifiées par perfusion intracardiaque de PFA 4% (1h après le DHE et 20mn après l'ICV) au début de

la phase nocturne. Dans un second temps, une immunofluorescence POMC a été réalisée afin de localiser l'expression du DHE au niveau des neurones POMC.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV entraîne une augmentation significative du signal DHE sous la forme d'une augmentation du nombre de spots/neurone POMC ( $p=0,035$ ) et de l'intensité de la fluorescence du DHE/neurone POMC ( $p=0,030$ ) par rapport au véhicule (NaCl) (**Figure 22 A-C**). Cette augmentation du signal DHE montre l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC induite par une administration exogène d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il n'y avait pas de différence de signal POMC (intensité de la fluorescence POMC/neurone, volume moyen et nombre des neurones POMC) entre les 2 groupes ce qui permettait de comparer l'expression du DHE quel que soit le traitement ICV sans biais lié au signal POMC. (**Figure 22 D et E**).





**Figure 22.**

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV (5  $\mu$ M) augmente l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard.

(A) Quantification du nombre de spots de DHE/neurones POMC

(B) Quantification de l'intensité de la fluorescence du DHE/neurone POMC

(C) Représentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC

(D) Quantification du volume des neurones POMC

(E) Quantification de l'intensité de la fluorescence des neurones POMC

Ces résultats confirment la validité de cette technique semi-quantitative pour mesurer de manière indirecte les ROS au niveau des neurones POMC. Ainsi, les effets aigus de l'administration ICV de modulateurs de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou honokiol) sur la prise alimentaire semblent impliquer la population des neurones à POMC au niveau du noyau arqué.

Au total, une augmentation centrale et aigue de ROS entraine à la fois une diminution la prise alimentaire et du poids corporel des souris, une activation des neurones de l'ARC et une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris nourries avec une alimentation standard.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle des ROS hypothalamiques au sein des neurones à POMC dans la contrôle de la prise alimentaire,

La seconde partie de notre travail a consisté à explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette forme de régulation de la balance énergétique, notamment en aval de la production de ROS et au niveau des neurones POMC.

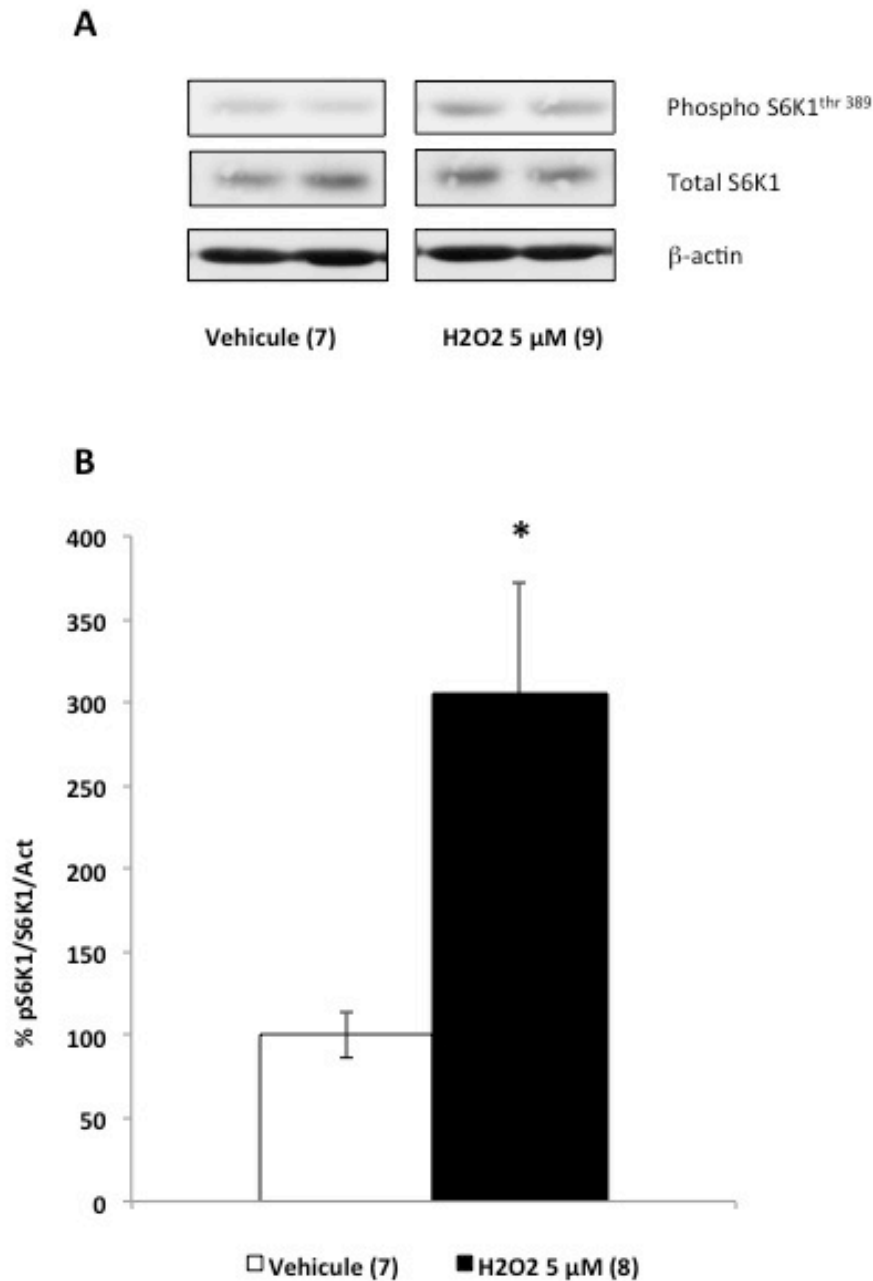


## **II. Le rôle de la voie mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par les ROS**

### **1. Effets de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur la phosphorylation de S6K1 au niveau hypothalamique**

Etant donné le rôle de la voie mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire et pour répondre à notre question sur une interaction éventuelle entre la voie mTORC1 et les ROS au niveau hypothalamique, nous avons étudié l'effet de l'administration ICV aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'expression hypothalamique de S6K1, une protéine effectrice de la voie mTORC1, qui est couramment utilisée comme marqueur d'activation de mTORC1 (Bullitt, 1990).

Les souris C57Bl6J, nourries avec une alimentation standard, ont été privées de nourriture pendant 24h. Une administration ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5  $\mu$ M (n=8) ou de son véhicule (NaCl ; n=7) a été réalisée avant le sacrifice des souris par dislocation cervicale, 1h après l'injection ICV et juste avant le début de la phase nocturne. La comparaison de l'expression de la forme phosphorylée de S6K1 par rapport à l'expression de la S6K1 totale et de la  $\beta$ -actine montre que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente de manière significative la phosphorylation de S6K1 au niveau de l'hypothalamus (p=0,03). **(Figure 23 A et B)**



**Figure 23.**

L'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente l'activation de la voie mTORC1 hypothalamique chez les souris C57Bl6J par rapport aux souris traitées par véhicule (NaCl).

(A) Image de western-blot représentant l'expression de la phospho-S6K1, la S6K1 totale et la β-actine.

(B) Quantification de la phosphorylation de S6K1 rapportée à la quantité totale de S6K1 et de β-actine.

Ainsi, une augmentation centrale et aigue de ROS active la voie mTORC1 hypothalamique.

Pour investiguer le rôle fonctionnel de la voie mTORC1 hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire induite par la modulation des niveaux de ROS, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de la voie mTORC1 sur les variations de prise alimentaire induites par d'administration aigue centrale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'honokiol. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches : ou bien un blocage génétique de la voie mTOR en utilisant un modèle de souris avec une voie mTORC1 défectueuse de manière constitutive (S6K1-KO) ou bien un blocage pharmacologique de mTOR par une injection ICV de rapamycine, inhibiteur bien connu de mTOR.

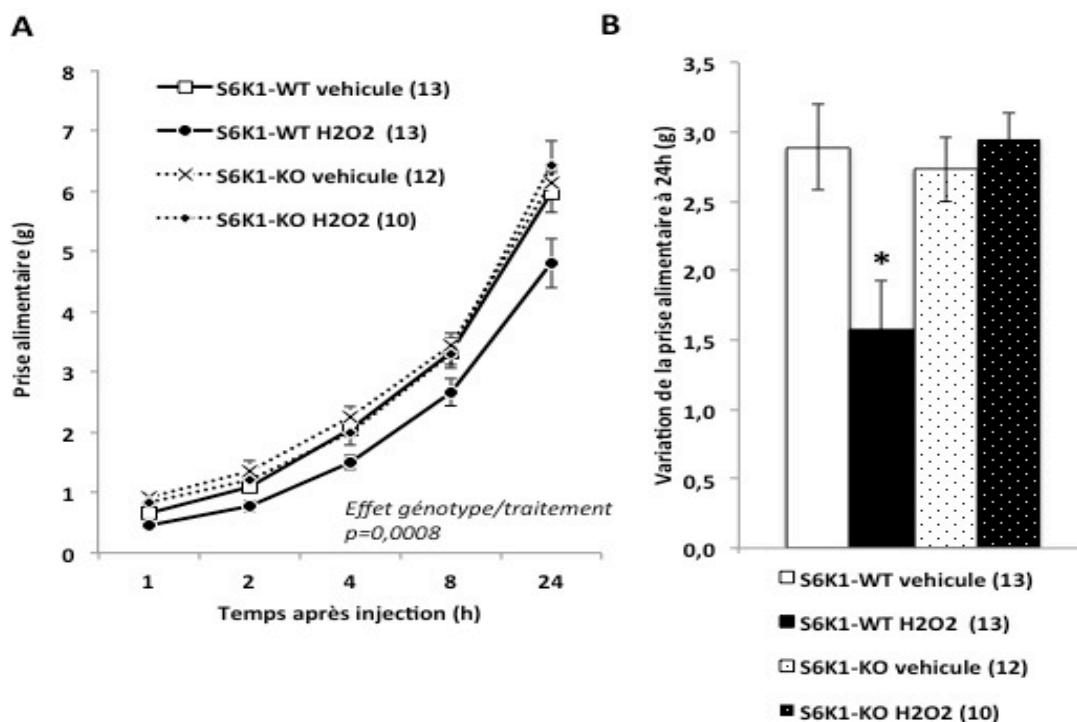
## **2. Effets de la modulation aigue des ROS sur la prise alimentaire des S6K1 WT et KO**

### **a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Des souris S6K1-WT (avec une voie mTORC1 fonctionnelle) et S6K1-KO (avec inactivation constitutive de S6K1 et une voie mTORC1 défectueuse), nourries avec une alimentation standard et privées de nourriture depuis 24h ont reçu par injection ICV de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 µM (n=13 WT et 10 KO) ou son véhicule (NaCl ; n=13 WT et 12 KO) juste avant le début de la phase nocturne.

L'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les souris S6K1 entraine une diminution significative de la prise alimentaire (Anova mesures répétées génotype/traitement p=0,0008) et du poids corporel (Anova p=0,043) chez les S6K1 WT, mais pas chez les KO. Les tests post-hoc (LSD Fisher) montrent une différence significative entre les 2 génotypes (p=0,01) ainsi qu'un effet génotype/traitement (p=0,0001).

En l'absence d'une protéine S6K1 fonctionnelle, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV n'est plus capable d'exercer son effet anorexigène. Cet effet sur la prise alimentaire pourrait dépendre de la protéine S6K1 et de la voie mTORC1. (**Figure 24 A et B**)



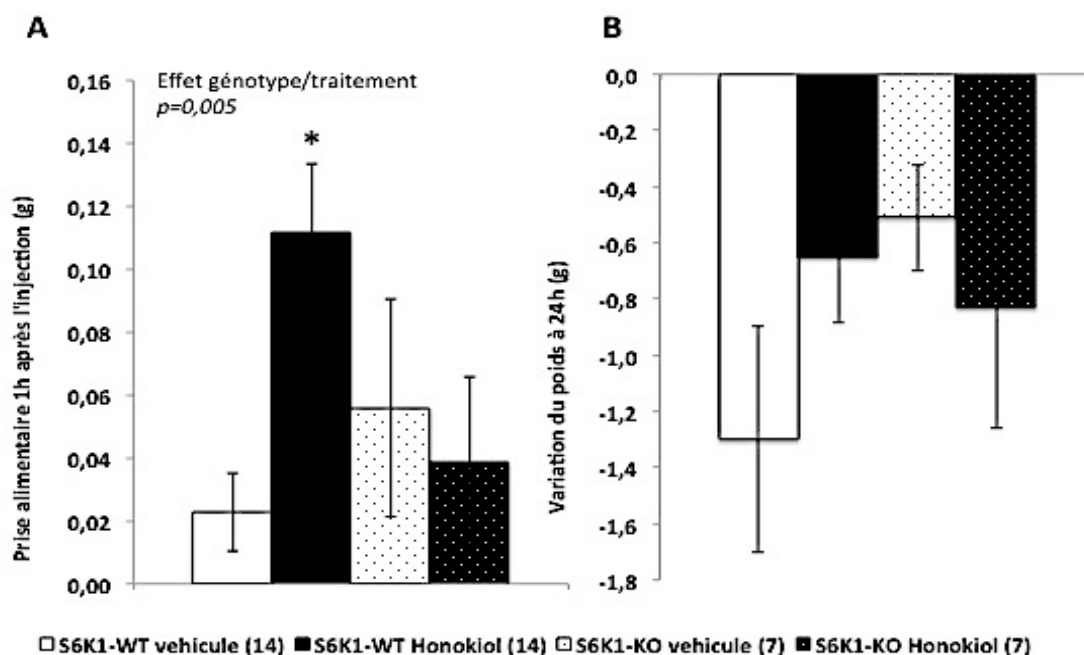
**Figure 24.**

L'administration aigue ICV d'H2O2 diminue la prise alimentaire (A) et le poids corporel (B) chez les souris S6K1-WT, mais pas chez les souris S6K1-KO, nourries avec une alimentation standard.

## b) Honokiol

Des souris S6K1-WT et S6K1-KO, nourries avec une alimentation standard et avec accès libre à la nourriture ont été injectées par voie ICV avec de l'honokiol à 376  $\mu$ M (n=14 WT et 10 KO) ou son véhicule (NaCl ; n=14 WT et 7 KO) à 9h, en phase diurne, 4h avant la phase nocturne.

L'administration aigue ICV d'honokiol entraine une augmentation significative de la prise alimentaire 1h après l'injection chez les S6K1-WT ( $p=0,04$ ), comme déjà décrit chez les C57Bl6J (**Figure 25**), mais pas chez les S6K1-KO. Les analyses post hoc (LSD Fisher) montrent l'existence d'un effet génotype/traitement ( $p=0,005$ ). L'effet de l'honokiol sur la variation de poids 24h après l'injection n'est pas significatif. (**Figure 25 A et B**)



**Figure 25.**

L'honokiol ICV augmente la prise alimentaire 1h après l'injection, chez les souris S6K1-WT, mais pas chez les souris S6K1-KO (A).

L'honokiol ne modifie pas significativement le poids corporel des souris S6K1-WT ou -KO (B).

Ces résultats obtenus en utilisant un modèle génétiquement modifié avec une inhibition constitutionnelle de la voie mTORC1 suggèrent que le contrôle central de la prise alimentaire impliquant les ROS nécessite une protéine S6K1 fonctionnelle.

Afin de vérifier que cet effet n'est pas seulement du à des altérations constitutionnelles propres à ce modèle génétiquement modifié, nous avons confirmé nos résultats à l'aide d'un modèle pharmacologique.

### 3. Effets de l'administration combinée d'un inhibiteur de mTORC1 et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la prise alimentaire

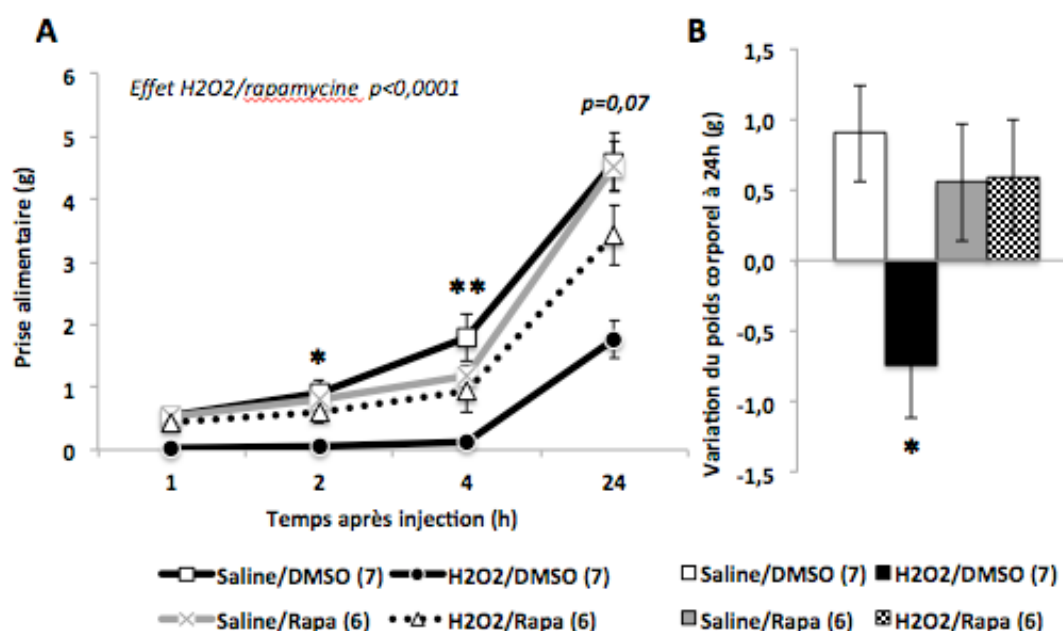
Pour cela, nous avons d'abord testé différentes concentrations de rapamycine (12, 18 et 25 µg/µL) pour trouver une dose de rapamycine non active sur la prise alimentaire. La rapamycine ICV à 25 µg/µL induit une diminution de la prise alimentaire à 1h et 2h, alors qu'à 18 µg/µL, l'effet orexigène de la rapamycine n'est plus observé.

Après un jeûne de 24h, des souris C57Bl6J ont été injectées ICV avec de la rapamycine (1µL/souris à 18 µg/µL), puis 40mn plus tard avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 µL à 5 µM), juste avant le début de la phase nocturne.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV administré de manière isolée diminue la prise alimentaire 1h (p=0,07), 2h (p=0,017), 4h (p=0,002) et 24h (p=0,07) après l'injection (**Figure 26 A**). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne également une diminution significative du poids corporel 24h après l'injection (p=0,05 ; **Figure 26 B**).

La rapamycine ICV administrée de manière isolée n'a pas d'effet sur la prise alimentaire ou le poids corporel à cette dose (**Figures 26 A et B**).

Chez les souris traitées par rapamycine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est plus significatif (**Figure 26 A**), suggérant que la rapamycine ICV et donc l'inhibition aigue centrale de la voie mTORC1 est capable d'inhiber l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV. Les analyses post hoc (LSD Fisher) montrent l'existence d'un effet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Rapamycine (p<0,001), confirmant l'effet significatif de la rapamycine sur la modulation de la prise alimentaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 26.**

L'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combinée à l'injection de DMSO (véhicule) diminue la prise alimentaire des souris C57Bl6J nourries avec un régime standard (A).

La rapamycine ICV à cette dose là n'a pas d'effet sur la prise alimentaire (A) ou le poids corporel (B).

L'administration concomitante de rapamycine et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lève l'inhibition de la prise alimentaire (A) et la perte pondérale (B) induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ces résultats obtenus après altération génétique ou pharmacologique de la voie mTORC1 sont donc concordantes et suggèrent que l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nécessite l'intégrité fonctionnelle de la voie mTORC1 au niveau hypothalamique.

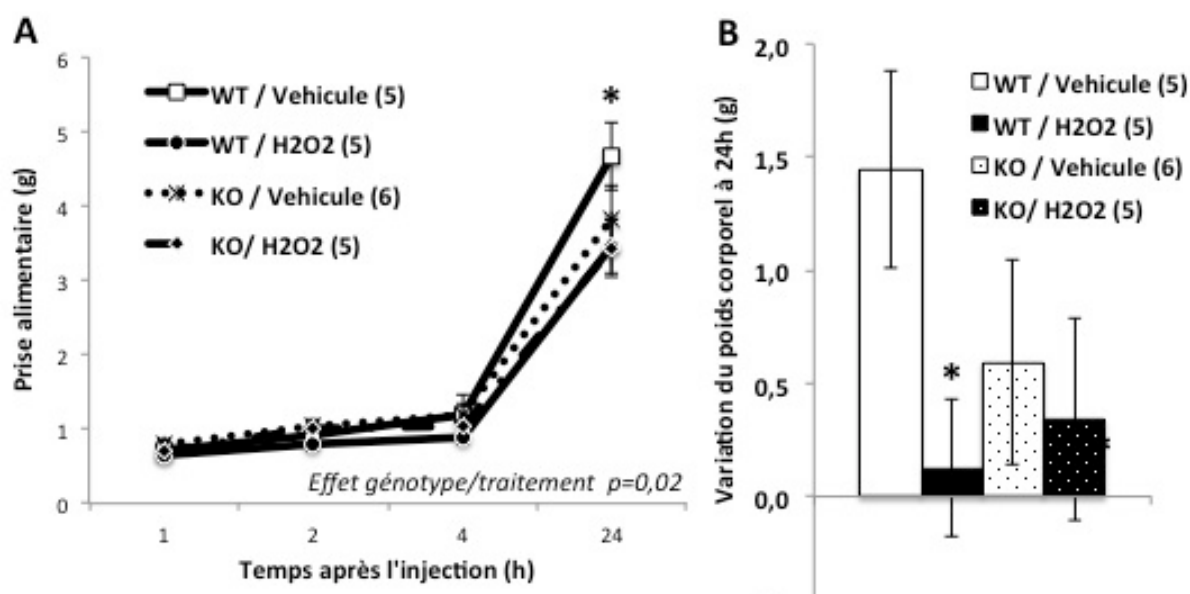
Compte-tenu de nos résultats sur la modulation des niveaux de ROS au niveau des neurones à POMC de l'ARC après administration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou honokiol, nous avons étudié l'impact de l'intégrité de la voie mTORC1 au sein de ces neurones sur le contrôle de la prise alimentaire induit par les ROS.

#### **4. Effets de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV des souris POMC-raptor-WT et -KO**

##### **a) Sur la prise alimentaire et le poids corporel**

Des souris POMC-raptor-WT (avec une voie mTORC1 fonctionnelle au niveau des neurones POMC) et POMC-raptor-KO (avec une inactivation constitutive de raptor et donc une voie mTORC1 non fonctionnelle au niveau des neurones POMC), nourries avec une alimentation standard, ont été privées de nourriture pendant 24h. Puis, une injection aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 µM (n=5 WT et 5 KO) ou son véhicule (NaCl ; n=5 WT et 6 KO) a été réalisée juste avant le début de la phase nocturne.

L'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les souris raptor-POMC entraine une diminution significative de la prise alimentaire (Anova mesures répétées ; p=0,008) et du poids corporel à 24h (Anova p=0,037) chez les POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO (Anova mesures répétées p=0,8). Les analyses post hoc (LSD Fisher) montrent l'existence d'un effet génotype/traitement (p=0,02). **(Figure 27 A et B)**



**Figure 27.**

L'administration aiguë d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue la prise alimentaire (A) et le poids corporel (B) chez les souris POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO.

Ces résultats montrent que l'administration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV requiert l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones anorexigènes POMC pour diminuer la prise alimentaire et le poids corporel.

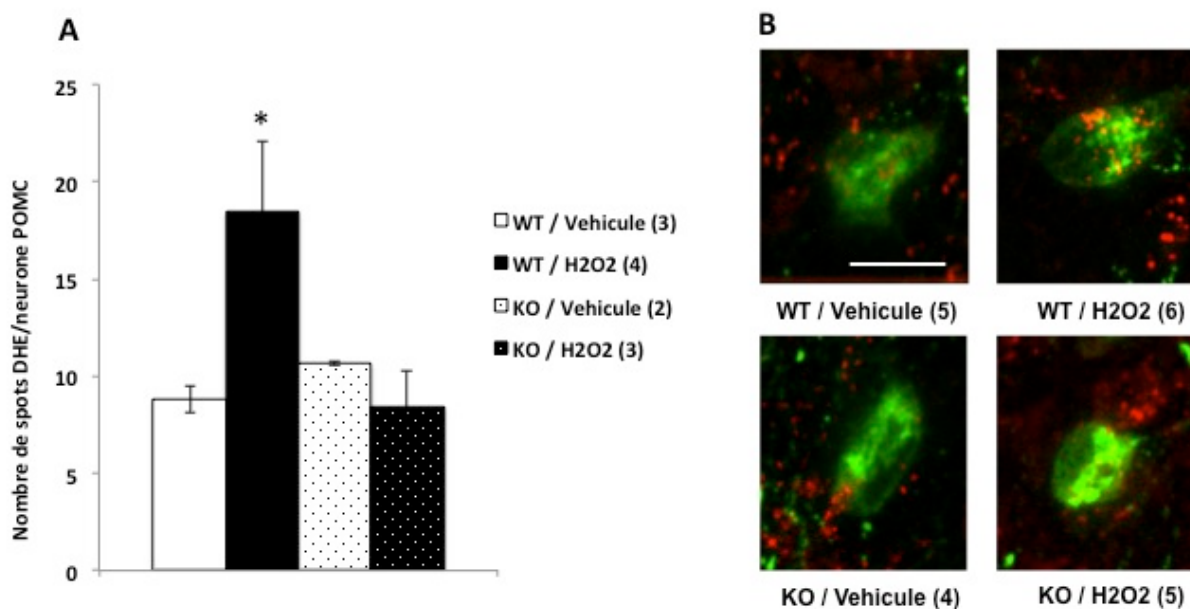
Si mTORC1 est nécessaire à l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV, il pourrait également être impliqué dans l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV.

### **b) Sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC**

Pour étudier le rôle potentiel de mTORC1 dans la régulation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, des souris POMC-raptor-WT et -KO ont d'abord reçu une injection IP de DHE, puis 40 mn plus tard une injection ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5  $\mu$ M (n=5 WT et 6 KO) ou de NaCl (n=4 WT et 5 KO), juste avant le début de la phase nocturne. Les souris étaient sacrifiées par perfusion 1h après le DHE et 20mn après le traitement ICV.

Chez les souris POMC-raptor-WT, l'administration aiguë ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une augmentation significative de l'expression du DHE (nombre moyen de spots de DHE/neurone POMC p=0,05 ; **Figure 28 A**) et donc de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC (**Figure 28 B**). Cet effet n'est pas présent chez les POMC-raptor-KO.





**Figure 28.**

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV diminue l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO.

(A) Quantification du nombre de spots de DHE/neurone POMC chez les souris POMC-raptor-WT et -KO traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou son véhicule.

(B) Images représentant l'expression du DHE (en rouge) au niveau des neurones POMC (en vert) chez les souris POMC-raptor-WT et -KO.

Ces résultats montrent que l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC est à la fois nécessaire pour l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV et pour l'augmentation de l'expression des ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux interactions possibles entre les ROS et la leptine, une cytokine dont le rôle physiologique dans la régulation de la prise alimentaire est largement établi, qui cible les neurones à POMC hypothalamiques et qui nécessite également l'intégrité de la voie mTORC1 pour exercer son effet anorexigène (Cota et al., 2006) (Cota et al., 2008).

### **III. Le rôle des ROS et de la voie mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par la leptine**

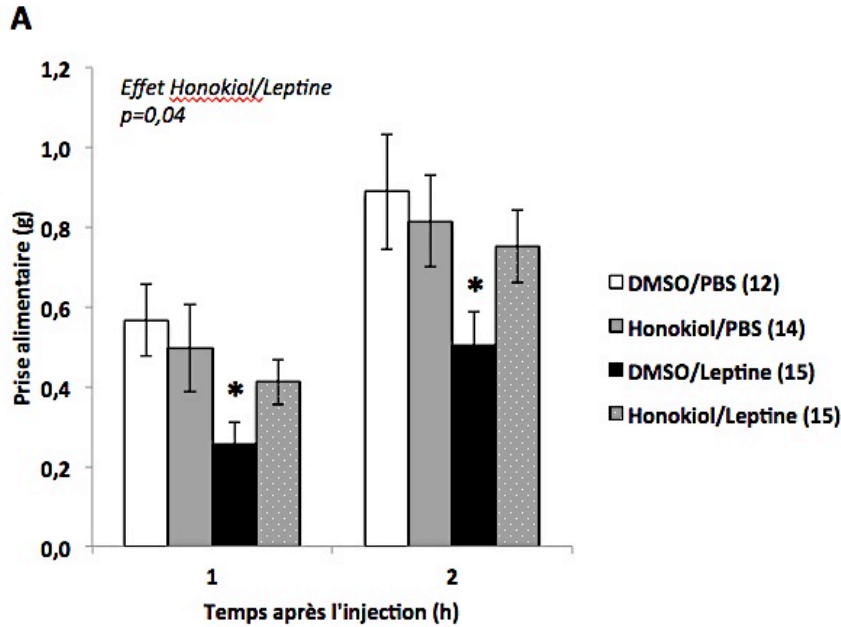
#### **1. Effets de l'administration ICV concomitante d'un piègeur de ROS (honokiol) et de la leptine (activateur de mTORC1) sur la prise alimentaire**

Notre première approche a été d'évaluer les conséquences du blocage central des ROS sur l'effet anorexigène de la leptine en utilisant de l'honokiol, piègeur de ROS.

Des souris C57Bl6J ont été traitées par une injection aigue ICV d'honokiol, à une dose que nous avons déterminée au préalable comme étant sans effet sur la prise alimentaire (2  $\mu$ L à 376  $\mu$ M) ou son véhicule (DMSO). Celle-ci a été immédiatement suivie d'une injection aigue IP de leptine (0,1 ml à 2,5 mg/kg, dose connue pour son effet anorexigène) ou de PBS, à 9h, 4h avant le début de la phase nocturne.

L'injection IP de leptine, lorsqu'elle est précédée d'une injection ICV de DMSO (n=15), confirme dans notre modèle son effet anorexigène puisqu'elle diminue la prise alimentaire 1h (p=0,0035), 2h (p=0,0086) et 4h (p=0,022) après l'injection, sans effet significatif sur le poids corporel, comparativement aux souris « contrôles » traitées par DMSO ICV et PBS IP (n=12). Comme attendu, l'injection ICV d'honokiol suivie d'une injection IP de PBS ne modifie pas la prise alimentaire, ni le poids corporel (n=14).

Par contre, l'effet anorexigène de la leptine IP est significativement réduit en cas de co-administration avec l'honokiol ICV (n=15 ; p=0,049 à 1h et p=0,050 à 2h ; Anova mesures répétées p=0,03). Les analyses post-hoc (Fisher LSD) montre une interaction honokiol/leptine (p=0,04) (**Figure 29**).



**Figure 29.**

L'administration de leptine IP suivant l'injection ICV de DMSO (véhicule) diminue la prise alimentaire 1h et 2h après l'injection.

L'administration d'honokiol ICV combinée à une injection IP de PBS (véhicule) n'a pas d'effet sur la prise alimentaire et le poids corporel chez les souris C57Bl6J.

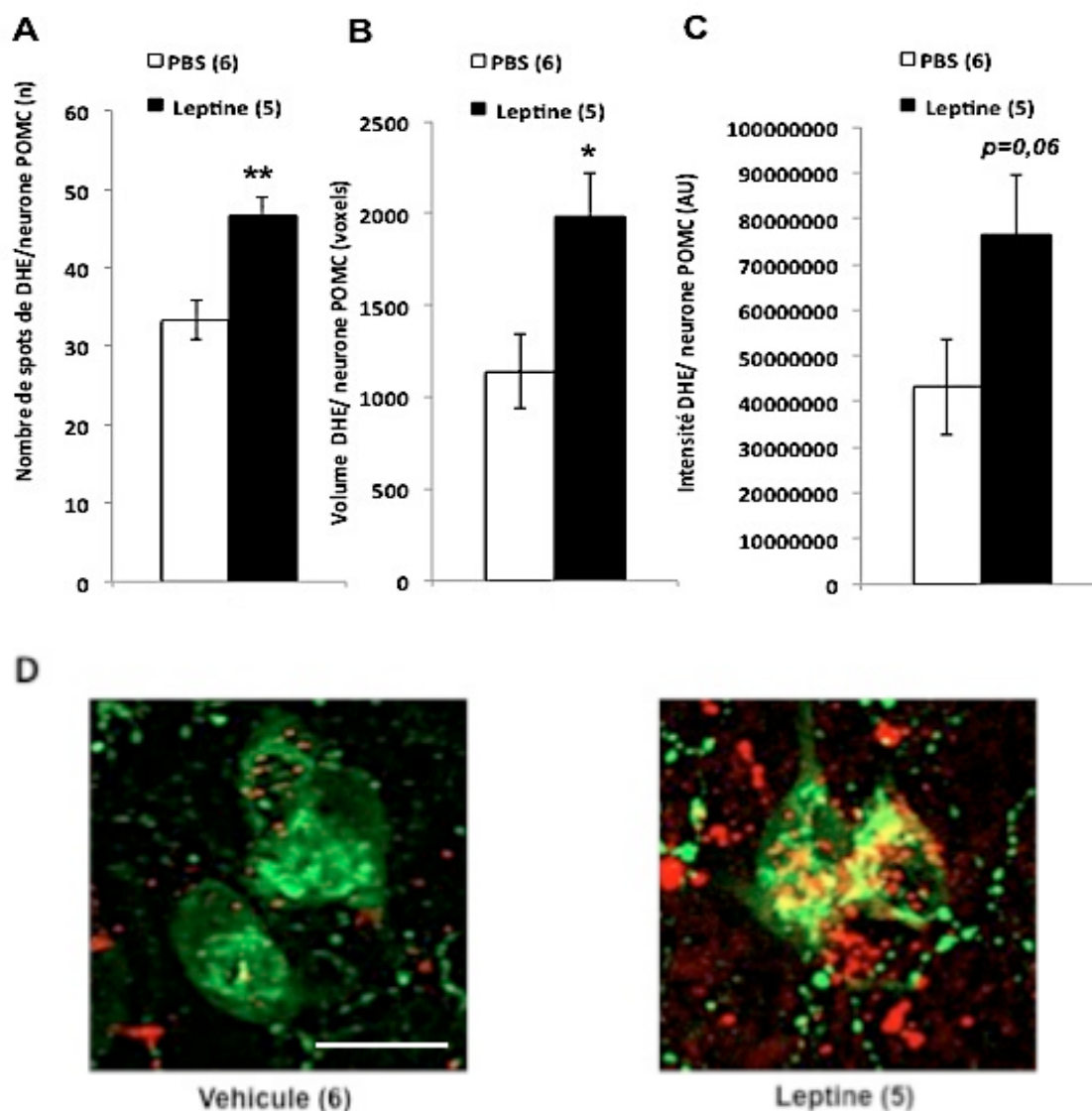
En cas d'administration combinée de leptine IP et d'honokiol ICV, la leptine n'exerce plus d'effet anorexigène significatif.

Ainsi, nos résultats suggèrent l'existence d'un lien entre les ROS et l'effet anorexigène de la leptine. Une hypothèse serait que la leptine entraîne une augmentation ponctuelle des niveaux de ROS au niveau hypothalamique et en particulier au niveau des neurones POMC de l'ARC, neurones connus pour leur implication dans l'effet anorexigène de la leptine.

## **2. Effets de l'administration aigue de leptine sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris C57Bl6J**

Pour étudier l'effet de la leptine sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, des souris C57Bl6J ont d'abord reçu une injection IP de DHE (0,2 ml/souris à 1 mg/ml). Puis 45 mn plus tard, une administration ICV de leptine (n=5) ou de PBS (n=6) a été réalisée, en phase diurne, à 9h, 4h avant le début de la phase nocturne, sans reprise alimentaire. Les souris ont été sacrifiées 15 mn après l'injection ICV et 1h après l'injection de DHE, par perfusion intracardiaque de PFA 4%. Les coupes hypothalamiques extraites de ces animaux traités par leptine ou PBS ont ensuite été associées à une immunofluorescence POMC pour quantifier le signal DHE au niveau des neurones POMC.

L'analyse du signal DHE dans les neurones POMC montre une augmentation significative du nombre de spots/neurone POMC ( $p=0,0017$  ; **Figure 30 A**) et du volume occupé par les spots de DHE/neurone POMC ( $p=0,017$  ; **Figure 30 B**) chez les animaux traités par leptine par rapport à ceux traités par PBS. L'intensité de la fluorescence du DHE est également augmentée au niveau des neurones POMC des souris traitées par leptine même si celle-ci n'atteint pas le seuil conventionnel de significativité ( $p=0,06$  ; **Figure 30 C**).



**Figure 30.**

La leptine ICV augmente l'expression des ROS dans les neurones POMC des souris C57Bl6J.

(A) La leptine entraîne une augmentation du nombre de spots de DHE au niveau des neurones POMC.

(B) La leptine entraîne une augmentation du volume occupé par les spots de DHE au niveau des neurones POMC.

(C) La leptine entraîne une augmentation de l'intensité du DHE au niveau des neurones POMC.

(D) Images représentant l'expression des ROS (en rouge) au niveau des neurones POMC (en vert).

L'ensemble de ces résultats montre un lien étroit entre la leptine, l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV et une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones anorexigènes POMC. L'origine de cette augmentation d'expression des ROS reste néanmoins inconnue. Cet effet pourrait résulter d'une augmentation de la production des ROS, d'une modification de leur métabolisme intracellulaire, d'une diminution de leur élimination et d'une diminution de l'expression des systèmes antioxydants.

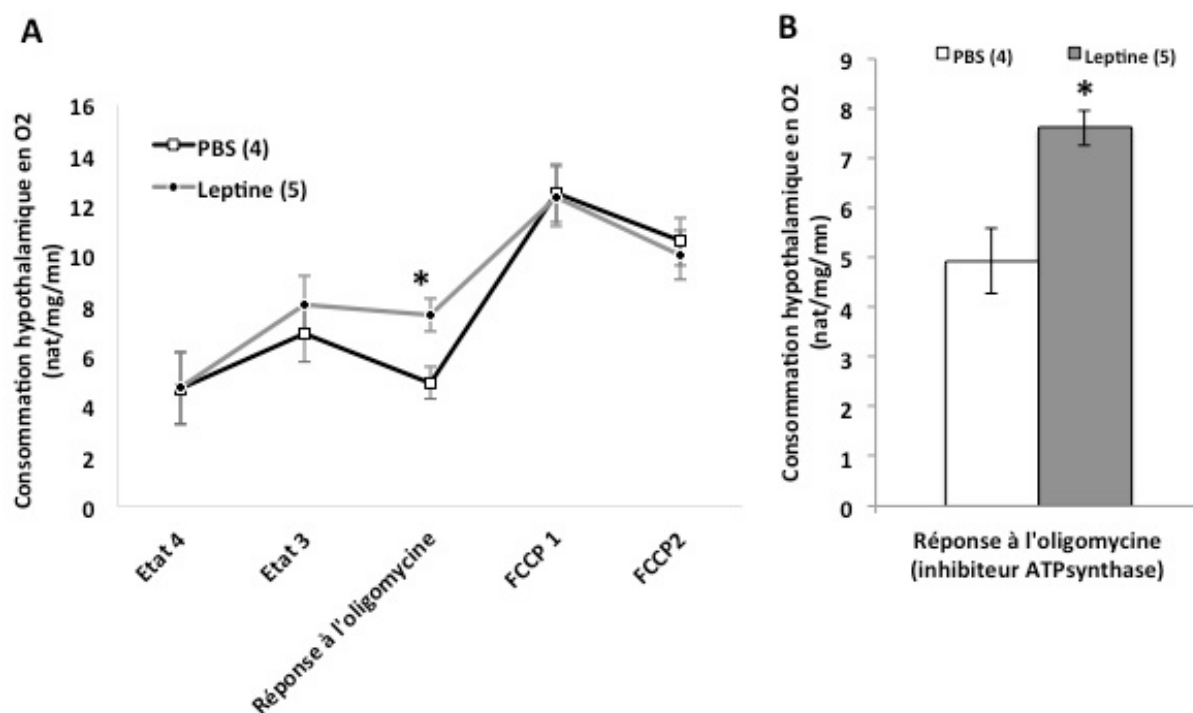
La respiration mitochondriale constitue la source principale de production de ROS intracellulaires. Nous nous sommes interrogés sur l'impact potentiel d'une administration ICV aigue de leptine sur la respiration mitochondriale au niveau hypothalamique.

### **3. Effets de l'administration aigue de leptine sur la consommation hypothalamique en oxygène des souris C57Bl6J**

Des souris C57Bl6J ont été injectées avec de la leptine ICV à 2,5 µg/µL ou du PBS 1µL/mice (à 9h, durant la phase diurne, 4h avant le début de la phase nocturne), puis sacrifiées 30 mn plus tard par dislocation cervicale pour extraire l'hypothalamus et analyser la consommation en oxygène des tissus (**Figure 31 A et B**).

La leptine modifie la consommation hypothalamique en oxygène lors du traitement par oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase. Les tissus extraits des souris préalablement traitées par leptine répondent moins bien à l'oligomycine et la consommation en oxygène reste relativement élevée comparativement aux tissus extraits de souris traitées par PBS (+55% consommation oxygène par rapport au véhicule). Ce résultat suggère une consommation d'oxygène indépendante de l'ATP synthase chez les souris traitées in vivo par leptine, potentiellement liée à une augmentation du découplage de la respiration mitochondriale.

Le % physiologique du découplage de la respiration mitochondriale varie selon la production des ROS : une augmentation de production de ROS peut notamment favoriser le découplage de la respiration mitochondriale (Toda and Diano, 2014).



**Figure 31.**

La leptine modifie la consommation en oxygène des tissus hypothalamiques de souris C57Bl6J (A). En cas de traitement par leptine, la réponse à l'oligomycine diminue (B).

Ainsi, nous montrons que la leptine ICV entraîne une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC et également une augmentation de la consommation d'oxygène au niveau hypothalamique. La leptine pourrait favoriser une augmentation de la production mitochondriale de ROS qui serait reliée à une augmentation du découplage mitochondrial. L'effet anorexigène de la leptine pourrait dépendre d'une augmentation aigüe de ROS au niveau des neurones POMC.

D'autre part, nous avons montré que l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC et l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV aigüe dépendent de l'intégrité fonctionnelle du complexe mTORC1.

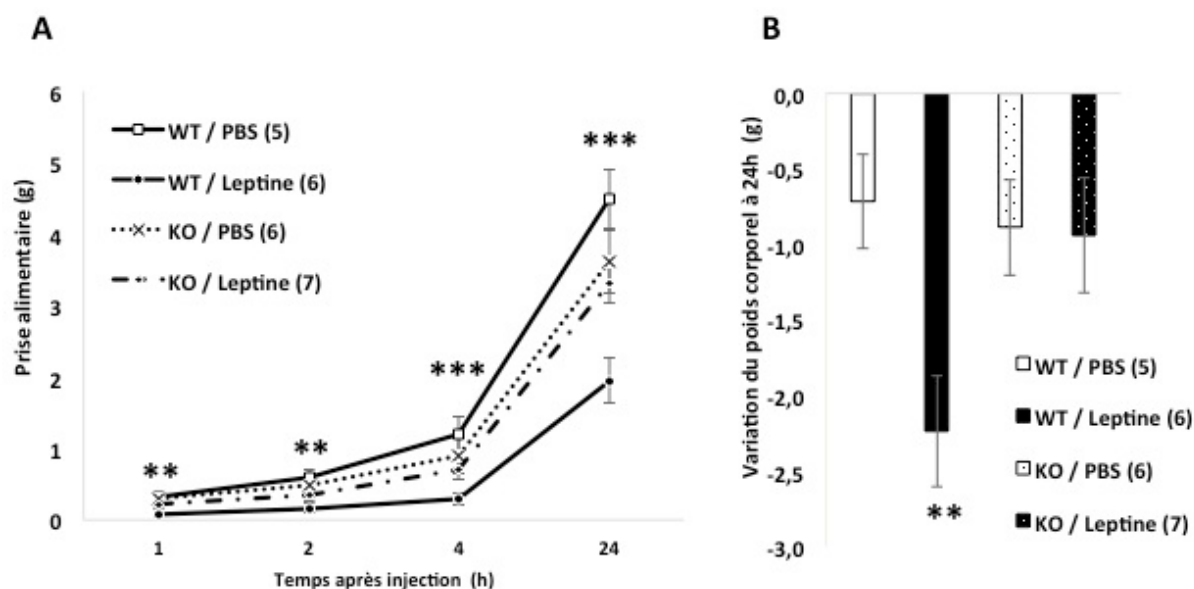
Nous nous sommes alors demandé si l'effet de la leptine sur la prise alimentaire et sur l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC dépendait également du complexe mTORC1, comme nous l'avons démontré pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié l'impact de la leptine sur la prise alimentaire et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris présentant une voie mTORC1 non fonctionnelle au niveau des neurones POMC.

## 4. Effets de l'administration aigue de leptine chez les souris POMC-raptor-WT et -KO

### a) Sur la prise alimentaire et le poids corporel

Des souris POMC-raptor-WT et POMC-raptor-KO ont été injectées par de la leptine ICV (2  $\mu$ L à 1,25  $\mu$ M ; n=6 -WT et n=7 -KO) ou par son véhicule (n=5 -WT et n=6 -KO) durant la phase diurne, à 9h, 4h avant le début de la phase nocturne. La leptine entraine une diminution significative de la prise alimentaire à 1h (p=0,003), 2h (p=0,006), 4h (p=0,0014) et 24h (p=0,0001) (**Figure 32 A**) et du poids corporel à 24h (p=0,006 ; **Figure 32 B**) chez les POMC-raptor-WT alors qu'elle est sans effet chez les souris POMC-raptor-KO (p=0,816).



**Figure 32.**

L'administration aigue de leptine ICV diminue la prise alimentaire (A) et le poids corporel (B) des souris POMC-raptor-WT, mais n'a pas d'effet chez les souris POMC-raptor-KO.

En l'absence d'un complexe mTORC1 fonctionnel au sein des neurones POMC, nous montrons ainsi que l'effet anorexigène de la leptine diminue de manière très significative (Anova mesures répétées p<0,00001).

L'intégrité de mTORC1 pourrait également s'avérer nécessaire au niveau des neurones POMC pour moduler l'augmentation locale des ROS induite par la leptine.

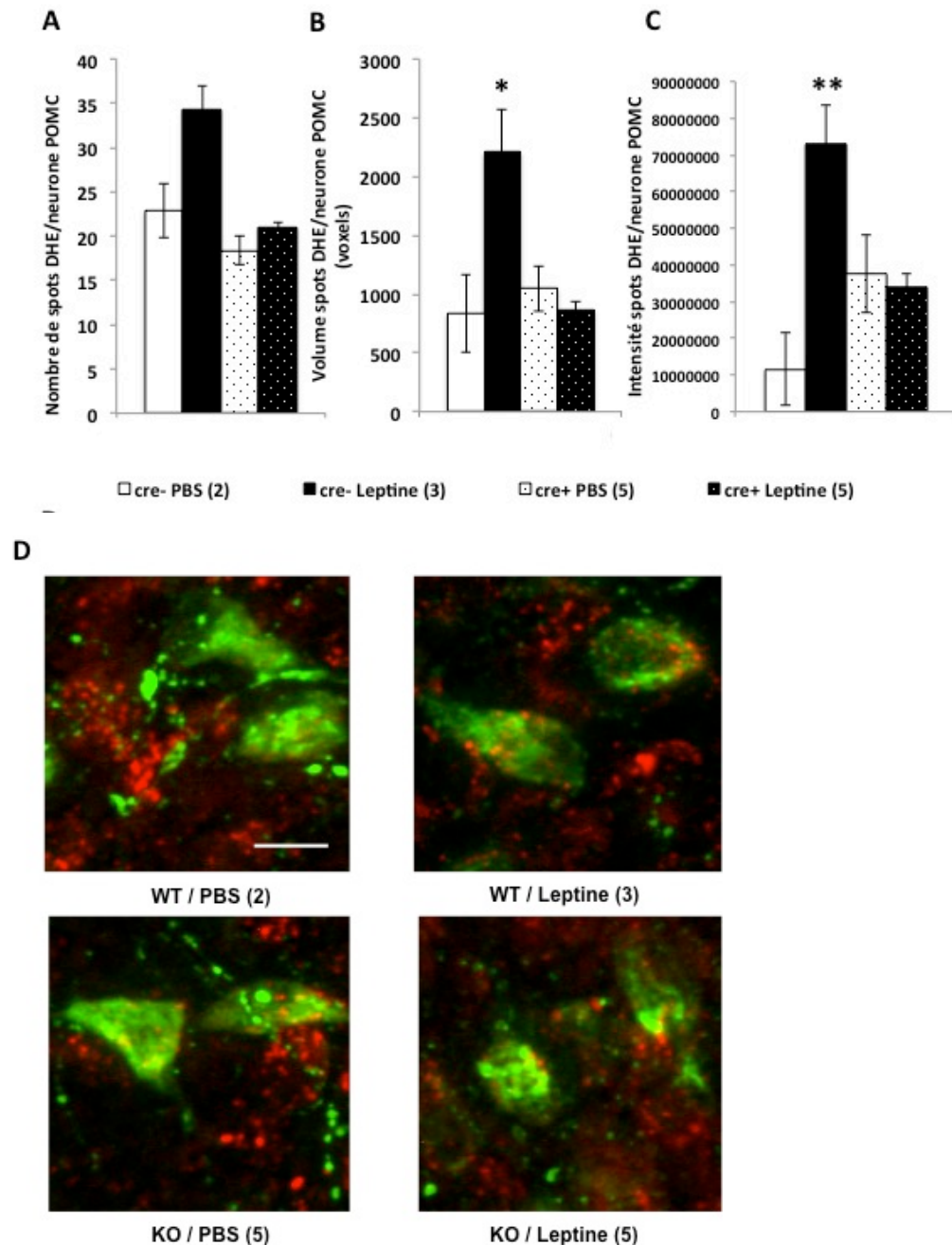


## **b) Sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC**

Pour mesurer l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, des souris POMC-raptor-WT et KO ont d'abord reçu une injection IP de DHE, puis 45 mn plus tard une injection ICV de leptine à 2,5 µg/µL (n=5 -WT et n=5 -KO) ou de PBS (n=2 -WT et n=3 -KO), à 9h, 4h avant le début de la phase nocturne. Les souris étaient sacrifiées par perfusion 1h après le DHE et 15 mn après le traitement ICV.

Chez les souris POMC-raptor-WT, l'administration aigue ICV de leptine entraine une augmentation significative de l'expression du DHE (volume occupé par les spots de DHE / neurone POMC ;  $p=0,036$  ; **Figure 33 B** ; et intensité fluorescence du DHE/neurone POMC ;  $p=0,0017$  ; **Figure 33 C** ; pas de variation significative du nombre de spots de DHE ; **Figure 33 A**) et donc de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC (**Figure 33 D**). Cet effet n'existe pas chez les POMC-raptor-KO (**Figure 33 A-D**)

Ainsi, la leptine nécessite un complexe mTORC1 fonctionnel au niveau des neurones POMC pour augmenter l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.



**Figure 33.**

La leptine ICV diminue l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-WT, mais pas chez les POMC-raptor-KO.

- (A) Quantification du nombre de spots de DHE/neurone POMC chez les souris POMC-raptor-WT et -KO traitées par la leptine ou son véhicule (PBS).
- (B) Quantification du volume occupé par les spots de DHE/neurone POMC chez les souris POMC-raptor-WT et -KO traitées par la leptine ou son véhicule (PBS).
- (C) Quantification de l'intensité de la fluorescence du DHE/neurone POMC chez les souris POMC-raptor-WT et -KO traitées par leptine ou son véhicule (PBS).
- (D) Images représentant l'expression du DHE au niveau des neurones POMC des souris POMC-raptor-WT et -KO.

## **SYNTHESE DES RESULTATS (Figure 34)**

**Une augmentation centrale aigue de ROS entraine à la fois une diminution la prise alimentaire et du poids corporel, une activation neuronale du noyau arqué et une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris nourries avec une alimentation standard.**

**Les ROS hypothalamiques semblent impliqués dans la régulation de la prise alimentaire au niveau des neurones POMC.**

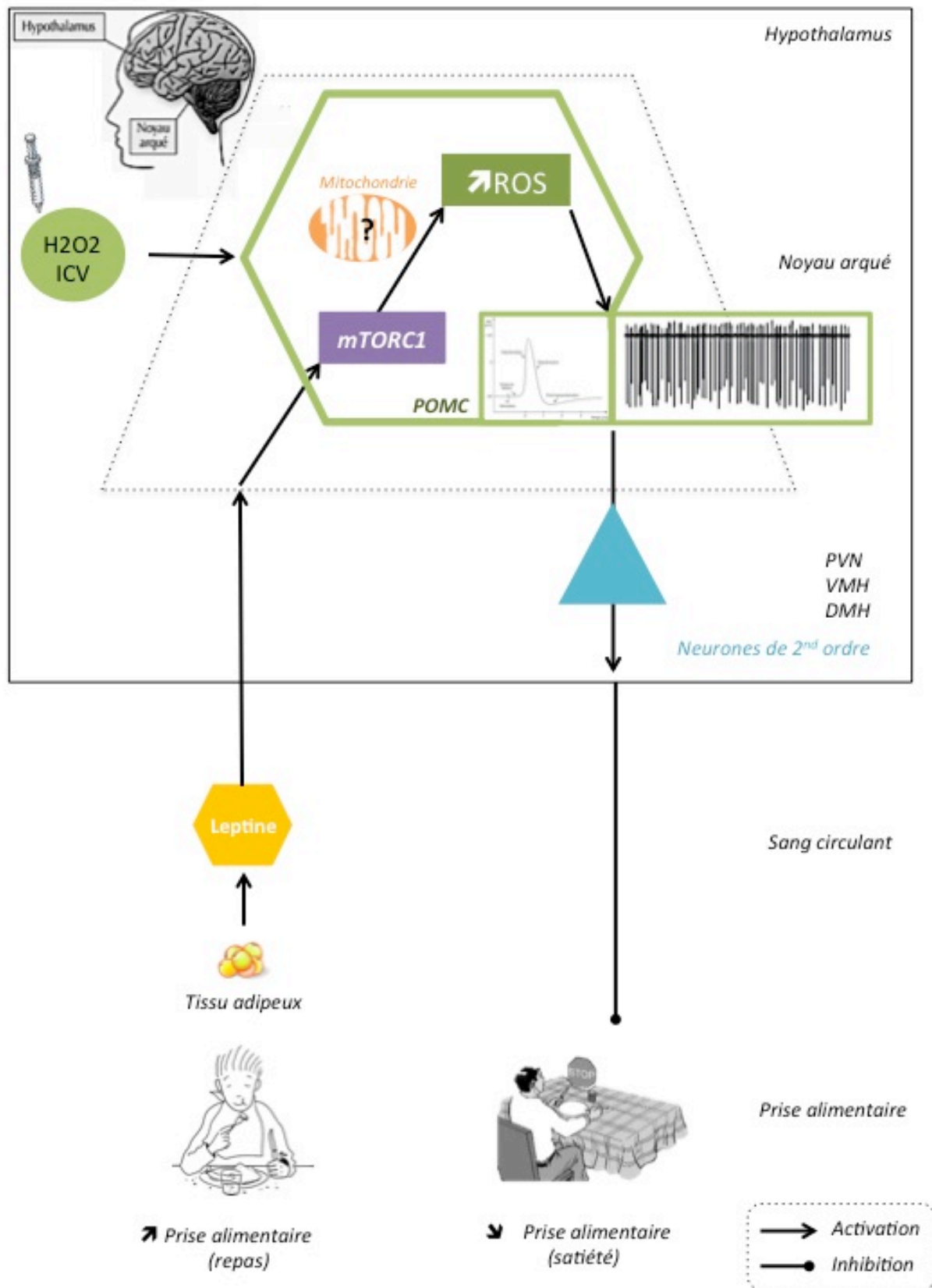
**L'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC est nécessaire pour l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC et pour l'effet anorexigène induits par une administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV.**

**L'effet anorexigène de la leptine semble dépendre d'une augmentation des ROS hypothalamiques.**

**L'administration aigue de leptine augmente l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris nourries avec une alimentation standard.**

**La leptine nécessite l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC pour augmenter l'expression des ROS au niveau des neurones POMC et pour exercer son effet anorexigène.**

FIGURE 34 : SYNTHESE



## . DISCUSSION

L'hypothalamus est une des structures cérébrales clés de l'homéostasie énergétique. Il joue notamment un rôle d'intégration des signaux nutritionnels et hormonaux provenant des organes périphériques, témoignant du statut énergétique de l'organisme. L'hypothalamus participe à l'orchestration des réponses homéostatiques sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. Du fait du caractère primordial de la fonction de nutrition, la régulation de la prise alimentaire est extrêmement sophistiquée et fait intervenir de multiples populations neuronales et voies de signalisations redondantes, plastiques et interconnectées. De multiples études scientifiques sont consacrées à l'étude de l'homéostasie énergétique et aux mécanismes physiologiques de contrôle de la prise alimentaire dans l'espoir d'identifier des mécanismes physiopathologiques, voire des agents pharmacologiques, pour lutter contre l'obésité, une maladie métabolique actuellement pandémique.

Notre étude aborde de manière globale un champ original qu'est l'implication des ROS dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique.

Au moment où nous abordons cette thématique, l'état des connaissances est issu de 4 publications essentielles et peut être résumé ainsi :

- ❖ L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV active les neurones POMC et diminue la prise alimentaire alors que l'administration aigue d'un piègeur de ROS (honokiol) active les neurones NPY/AgRP, inhibe l'activation des neurones POMC et augmente la prise alimentaire (Diano et al., 2011).
- ❖ En cas de balance énergétique positive, la leptine, activateur de mTORC1, stimule les neurones POMC (Cowley et al., 2001), favorisant une diminution de la prise alimentaire chez les souris nourries avec une alimentation standard. Cet effet dépend de l'intégrité de la voie mTORC1 (Cota et al., 2006). En cas d'obésité induite par l'alimentation, une résistance à la leptine apparaît et la leptine n'active plus l'activité PI3K au niveau hypothalamique (Metlakunta et al., 2008).
- ❖ Une corrélation entre la leptinémie et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC est retrouvée chez les souris nourries avec une alimentation standard. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez les souris obèses nourries avec un régime HFD (Diano et al., 2011).
- ❖ Les situations correspondant à un signal de balance énergétique négative comme le jeune sont associées à une diminution de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC (Diano et al., 2011).

- ❖ En situation de balance énergétique positive ou son équivalent (reprise alimentaire ; injection ICV d'insuline ou de glucose ou de triglycérides), une augmentation des ROS est observée au niveau hypothalamique (Leloup et al., 2006) (Benani et al., 2007) (Jaillard et al., 2009) ou au niveau des neurones POMC (Diano et al., 2011). L'administration conjointe de glucose ou d'insuline ou de triglycérides avec un anti-oxydant bloque l'augmentation des ROS hypothalamiques et la diminution de la prise alimentaire induites par ces différentes hormones et nutriments.

De nombreuses questions restent donc en suspens et parmi celles-ci nous avons cherché à préciser plus particulièrement les éléments suivants :

- ❖ Dans le travail de Diano, l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'honokiol ICV est respectivement assimilée à une augmentation ou une diminution centrale des ROS. Cependant, ces éléments n'étaient pas formellement prouvés et nous avons essayé d'étudier l'impact d'une injection ICV aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.
- ❖ Les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la modulation de la prise alimentaire induite par les ROS ne sont pas identifiées. La voie mTORC1 est une voie de signalisation capable de moduler la prise alimentaire au niveau hypothalamique (Cota et al., 2006) et également capable de moduler l'expression de gènes mitochondriaux et la production de ROS dans certains modèles cellulaires (Schieke et al., 2006). Nous avons recherché une interaction entre la voie mTORC1 et les ROS au niveau hypothalamique et au niveau des neurones POMC.
- ❖ Diano a identifié une corrélation entre la leptinémie et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris avec un poids normal et une alimentation standard. L'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une diminution de la prise alimentaire et une activation des neurones POMC, de manière similaire à la leptine dans des conditions physiologiques (en dehors de l'obésité). Nous nous sommes interrogés sur l'implication potentielle des ROS au niveau des neurones POMC dans l'action anorexigène de la leptine chez les souris non obèses et nourries avec une alimentation standard.

## **Etude de l'expression des ROS dans les neurones POMC**

Une partie de la thèse a été consacrée à la mesure de l'expression des ROS au niveau de certains types cellulaires hypothalamiques. Nous avons mis au point une technique semi-quantitative de mesure de l'expression du DHE au niveau des neurones POMC. Il s'agit d'une technique réalisable *in vivo* qui permet de mesurer indirectement l'expression des ROS spécifiquement dans les neurones POMC.

La majorité des techniques utilisées dans les publications quantifie l'expression des ROS au niveau de tissus ou bien au niveau de cultures cellulaires. Les méthodes les plus souvent utilisées sont les sondes DCFDA permettant de mesurer l'expression des hydroxyl, peroxy et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au niveau de cellules ou de tissus, par cytométrie de flux ou par microplaque de détection (Jaillard et al., 2009); les sondes MitoSOX ciblant spécifiquement la mitochondrie, au niveau de cellules, dont l'oxydation par le superoxyde produit une fluorescence rouge visible au microscope à fluorescence (Mukhopadhyay et al., 2007) et la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (Kohn, 2010).

De nombreux kits de marqueurs de stress oxydant comme le 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), un marqueur des cassures d'ADN induites par les ROS, sont également commercialisés et utilisables pour des western blots ou des analyses par immunohistochimie au niveau de tissus. Une étude sur le stress psychosocial a utilisé ce marqueur de stress oxydant au niveau hypothalamique chez des rats (Colaïanna et al., 2013). Nous avons testé ce marqueur par immunohistochimie et par immunofluorescence pour étudier l'effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur l'expression du 8OHdG au niveau des neurones POMC. Les expériences préliminaires n'ont pas retrouvé d'expression mesurable du 8OHdG au niveau du noyau arqué des souris, quel que soit le traitement aigu par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV ou par son contrôle. Ce type de marqueur mesure les ROS dans le cadre d'un stress oxydant, qui est un état pathologique. Or, dans le cadre de notre travail et de nos hypothèses, nous cherchons à mesurer des variations aiguës ou ponctuelles de ROS, chez des souris saines, non obèses, et donc ces marqueurs de stress oxydant ne sont pas forcément adaptés à la mesure d'une variation modérée ou ponctuelle de ROS.

La mesure de l'expression des enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase ou la catalase est une autre approche également possible au niveau hypothalamique (Songur et al., 2004). Un de nos objectifs était d'étudier l'expression des ROS spécifiquement au niveau des neurones POMC. C'est pourquoi nous n'avons pas utilisé ces techniques là en première intention. De plus, une augmentation des ROS peut résulter à la fois d'une augmentation de production intracellulaire de ROS (qui à son tour peut entraîner une augmentation de

l'expression des enzymes anti-oxydantes à visée régulatrice) ou bien d'une diminution de l'expression ou de l'activité des enzymes anti-oxydantes. Nous aurions pu tenter de mettre au point une double immunohistochimie mesurant à la fois l'expression d'une enzyme anti-oxydante comme la catalase et l'expression de POMC. Cependant, dans le cadre de notre travail, nous étudions des variations aiguës de ROS et non pas chroniques comme dans la majorité des études et cette démarche nous a donc paru un peu trop hasardeuse et compliquée. Afin de corrélérer au mieux les modifications comportementales induites lors de nos expériences aux modifications du métabolisme cellulaire des neurones POMC, nous avons choisi d'étudier les variations de ROS en utilisant le DHE.

Le DHE est un composé qui émet une fluorescence rouge en présence de superoxyde (spectre d'excitation 535 nm et spectre d'émission 635 nm ; (Zielonka et al., 2008)), capable de franchir les membranes cellulaires et de s'insérer avec l'ADN. Le superoxyde étant rapidement métabolisé en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'enzyme superoxyde dismutase, le DHE est utilisé comme marqueur d'expression des ROS au niveau des tissus, des cellules et des mitochondries isolées.

Nous nous sommes inspirés du protocole décrit par l'équipe de Diano et al. qui utilise des souris POMC-GFP (souris exprimant une fluorescence spontanée GFP au niveau des neurones POMC) (Diano et al., 2011). Nous avons d'abord étudié le composé chez des souris POMC-YFP (spectre d'excitation 514 nm et spectre d'émission 527 nm). La comparaison du mode d'administration IP ou IV du DHE nous a permis de conclure à une similarité en terme de signal (morphologie, localisation et intensité de la fluorescence du DHE).

Le signal DHE se présente sous la forme de petits points localisés au niveau du cytoplasme comme décrit dans Diano et al. Il pourrait s'agir d'une localisation mitochondriale, mais aussi peroxysomale. Pour vérifier la localisation exacte du DHE, il aurait fallu associer l'injection de DHE *in vivo* à une immunofluorescence avec un marqueur spécifique des mitochondries ou des peroxysomes (marqueurs de la membrane externe mitochondriale ou de l'ATP synthase par exemple). Cependant nous pouvons supposer qu'il s'agit ici d'une localisation mitochondriale car l'étude de Andrews et al. retrouve un signal similaire au notre et décrit une localisation mitochondriale du DHE (Andrews et al., 2008). Dans l'étude de Koch et Horvath 2015, le signal DHE présente une morphologie et une localisation différentes par rapport aux publications précédentes (Diano ; Andrews) et par rapport à nos résultats. En effet, le signal



est localisé à la fois au niveau membranaire et au niveau nucléaire (lieu intercalation ADN ?) sous la forme d'une localisation unique nucléaire. Dans cette publication (Koch et al., 2015), le protocole d'administration du DHE est différent puisque le DHE est injecté 35mn avant le sacrifice contrairement aux études de Diano et Andrews dans lesquelles il est injecté 3 heures avant le sacrifice). Ces variations de protocoles expérimentaux pourraient expliquer la différence de localisation du signal DHE dans la cellule. Le métabolisme intracellulaire du DHE est mal connu, mais on peut émettre l'hypothèse que le DHE traverse d'abord les membranes cellulaires, avant d'agir ensuite sur les mitochondries. Des études complémentaires sur la cinétique intracellulaire du DHE seraient intéressantes pour expliquer ces différences de signal.

Pour caractériser le signal DHE, nous avons choisi d'étudier 3 paramètres différents d'expression des ROS : le nombre de points de DHE (spots) par neurone POMC, l'intensité et le volume occupé par les spots par neurone POMC. Dans les publications utilisant le DHE in vivo (Diano et Andrew), le nombre de spots est retenu comme critère reflétant l'expression des ROS. Dans l'étude d'Horvath (Koch et al., 2015), l'aire moyenne occupée par le DHE au niveau d'un neurone POMC est le critère choisi pour évaluation et les résultats sont rapportés en % par rapport au véhicule. Dans nos expériences, nous avons également tenu compte du volume moyen des neurones POMC dans chaque groupe de traitement pour l'évaluation du nombre de spots et du volume de spots afin d'éviter tout biais lié aux variations de taille neuronale.

Le signal lié au DHE est difficile d'analyse car il existe une autofluorescence significative au niveau du noyau arqué en l'absence de DHE. Nous avons mis en évidence cette autofluorescence au cours d'une discussion avec l'équipe de Dijon et en étudiant la publication de Koch et al. où ce problème technique est mentionné pour la première fois par cette équipe (Koch et al., 2015). Une autofluorescence similaire est décrite lors de l'utilisation de DHE dans des tissus extra-hypothalamiques comme l'intestin chez des *C. Elegans* (Wüstner et al., 2010). Une autofluorescence spontanée est observée au niveau de l'hypothalamus de souris sacrifiées selon le même protocole (PFA 4%) et non injectées avec du DHE. Nous n'avons pas trouvé d'explication à ce phénomène, mais nous en avons tenu compte dans la quantification du signal DHE, lors de la détermination du seuil de détection du DHE.

Une fois la dose de DHE (1 mg/ml ; 0,2 ml/souris comme dans Diano et al.) et le mode d'administration choisis (IP), nous avons testé le composé chez des souris C57Bl6J, en

association avec une immunofluorescence POMC, afin de pouvoir multiplier les expériences sans être limité par la disponibilité d'un nombre suffisant d'animaux POMC-YFP. Ainsi, cette procédure permet la mesure de l'expression des ROS dans les neurones POMC à la fois chez les souris C57Bl6J et chez les POMC-YFP.

Cette méthode de quantification des ROS au niveau des neurones POMC présente des contraintes techniques liées à l'oxydation rapide et la photosensibilité du composé, mais elle permet de mesurer l'expression des ROS *in vivo* au niveau d'un type cellulaire donné. Cette technique pourrait être améliorée en testant des séquences chronologiques différentes (différents temps de sacrifice ; injection de la drogue d'intérêt avant et non pas après le DHE).

### **La modulation aigue des ROS au niveau hypothalamique modifie l'activité neuronale au sein du noyau arqué et modifie également la prise alimentaire.**

Nos résultats montrent que l'administration exogène aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV, réalisée après un jeûne préalable de 24h, diminue pendant 24h la prise alimentaire chez les souris C57Bl6J, en accord avec ce qui est décrit dans l'étude de Diano et al. (Diano et al., 2011). L'administration aigue d'honokiol ICV, un piègeur de ROS qui interfère avec la production et la migration des ROS (Zhao and Liu, 2011), entraîne une augmentation significative de la prise alimentaire. Nous confirmons donc les résultats des travaux de Diano et al.. Néanmoins, nos résultats diffèrent car nous observons l'effet orexigène de l'honokiol une heure après l'administration, et pas à 2h, 4h et 24h après l'injection, alors que l'effet orexigène observé par Diano et al. perdure 1h à 8h après l'injection. Cette différence pourrait s'expliquer par le type de cycle jour/nuit 12h/12h (standard 8h-20h dans Diano et al. vs décyclé 1h-13h dans notre animalerie) auquel sont soumis les animaux. Ainsi, dans l'étude de Diano, les souris sont injectées à 9h et la mesure de la prise alimentaire jusqu'à 8h après l'injection est réalisée en phase diurne. Dans nos expériences, les souris sont injectées également à 9h, mais la phase nocturne commence à 13h et non pas à 20h, ce qui veut dire que nos souris sont injectées 4h avant la phase nocturne, phase principale d'alimentation des rongeurs et que le recueil de la prise alimentaire est réalisé juste avant et pendant le début de la phase nocturne, phase pendant laquelle l'ensemble des souris se nourrit. Les souris de Diano et al. sont injectées juste après la fin de la phase nocturne, une phase où les souris sont davantage rassasiées et où une différence de prise alimentaire de type orexigène est classiquement plus facile à mettre en valeur. D'autre part, le génotype exact (C57Bl6J ou N), l'âge des animaux et la proportion

d'éthanol dans la solution ne sont pas précisés dans l'article et pourraient également différer et expliquer en partie les différences de résultats.

Nous montrons que l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV entraine non seulement une diminution de la prise alimentaire, mais aussi une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC (**Figure 22**). Le mécanisme exact d'augmentation d'expression des ROS (production, transport, nature des ROS mesurés) reste à préciser. Cette augmentation de ROS pourrait correspondre à la mesure de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène qui serait entré dans les cellules à proximité de la zone d'injection ou bien à une production locale de ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV.

Nous avons montré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aigue ICV est associé à une augmentation de l'expression de c-fos au niveau du noyau arqué et l'équipe de Diano a montré que ce traitement entraine également une augmentation de l'activité électrique des neurones POMC. Ainsi, une augmentation centrale et aigue des ROS hypothalamiques par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène ICV entraine à la fois une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, une activation des neurones POMC et une diminution la prise alimentaire et du poids corporel des souris nourries avec une alimentation standard.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une augmentation aigue de ROS pourrait être impliquée dans l'activation des neurones anorexigènes POMC entraînant par conséquence une diminution de la prise alimentaire.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de diminution significative de l'expression du DHE dans les neurones POMC lors du traitement aigue ICV par honokiol avec sacrifice des animaux 20mn plus tard (données non présentées). Etant donné que nos résultats montrent une cinétique d'action de l'honokiol différente de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (effet bref sur la prise alimentaire 1h après l'injection seulement), nous ne pouvons exclure des variations très brèves de l'expression des ROS de quelques minutes et, ces expériences pourraient être répétées en diminuant l'intervalle de temps entre l'injection d'honokiol et le sacrifice des animaux. Les travaux de Diano et al., montrent qu'une injection aigue d'honokiol ICV diminue l'expression de c-fos dans les neurones POMC (Diano et al., 2011) des souris nourries avec une alimentation standard ce qui plaide en faveur d'une modulation négative de l'activité des neurones POMC en cas d'inhibition centrale des ROS .

De plus, en cas de balance énergétique négative comme lors d'un jeûne de 18h (fasting), une diminution de l'expression des ROS et une diminution de l'activité électrique sont observées au niveau des neurones POMC (Diano et al., 2011) chez les souris alimentées avec un régime

standard par rapport aux souris avec un accès libre à la nourriture (fed). Ces données sont compatibles avec l'existence d'une corrélation entre les niveaux d'expression des ROS et l'activité électrique des neurones POMC. Chez ces souris avec un poids normal et une alimentation standard, il existe une différence très significative d'expression des ROS au niveau des neurones POMC selon le statut métabolique de l'organisme (fasting/fed).

De manière intéressante, en cas d'obésité induite par l'alimentation (DIO) chez des souris nourries avec une alimentation HFD, l'expression des ROS au niveau des neurones POMC est similaire à celle des souris non obèses nourries avec une alimentation standard et avec accès libre à la nourriture (Diano et al., 2011) (par opposition aux souris placées en état de jeûne). Par ailleurs, la fréquence du potentiel d'action des neurones POMC est réduite chez les souris DIO par rapport aux souris non obèses alors que celle des neurones NPY/AgRP est au contraire plus élevée. La moitié des neurones POMC sont « silencieux » (sans activité électrique) chez les souris obèses (DIO) par rapport aux souris non obèses. Chez ces souris obèses, l'administration aigüe d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV entraîne une augmentation de l'expression de c-fos au niveau des neurones POMC et une diminution de la prise alimentaire par rapport aux souris obèses traitées par véhicule (Diano et al., 2011). D'après nos résultats, ces effets pourraient être associés à une augmentation de ROS induite par l'administration aigüe d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC (**Figure 22**).

L'ensemble de ces données suggère qu'en situation d'alimentation standard, une augmentation aigüe de ROS au niveau des neurones POMC permettrait d'activer les neurones POMC et de diminuer la prise alimentaire. En cas de régime HFD, une altération des variations ponctuelles de ROS induites par le jeûne ou la prise alimentaire au niveau des neurones POMC (potentiellement liée à une accumulation excessive et/ou chronique de ROS) pourrait expliquer la diminution de l'activité électrique des neurones POMC et la proportion de neurones POMC silencieux.

Rétablir une augmentation brève de ROS au niveau des neurones POMC par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV aigüe permet apparemment de restaurer la fonction des neurones POMC, altérée en cas d'obésité. Les travaux de Diano ont également mis en évidence une augmentation du nombre de mitochondries (source de production des ROS lors de la phosphorylation oxydative) au niveau des neurones POMC chez les souris avec un accès libre à la nourriture par rapport aux souris privées de nourriture (fasting) alors que le nombre de peroxysomes est similaire quel que soit le statut alimentaire. Chez les souris obèses DIO, le nombre de mitochondries au

niveau des neurones POMC est similaire à celui observé chez les souris avec un poids normal et un accès libre à la nourriture (tout comme le niveau local d'expression des ROS), mais le nombre de peroxysomes est 3 fois plus élevé. Diano et al. suggèrent que cette augmentation des peroxysomes pourrait altérer la fonction des neurones POMC en cas d'obésité. Etant donné que les peroxysomes sont impliqués dans le contrôle des ROS (rôle de détoxification) (Schrader and Fahimi, 2006), cette augmentation des peroxysomes associée à l'obésité DIO pourrait correspondre à un mécanisme de régulation des ROS, activé devant une augmentation chronique de production des ROS au niveau des neurones POMC. L'augmentation chronique du nombre de peroxysomes pourrait interférer avec les variations aiguës de ROS au niveau des neurones POMC nécessaires à leur activité électrique. Cette hypothèse est particulièrement intéressante et nécessiterait des explorations complémentaires.

De même, les ROS pourraient être impliqués dans l'altération des neurones POMC décrite lors du vieillissement, favorisant une prise de poids avec l'âge (Chapman, 2008). Une augmentation de l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale est décrite au niveau de l'hypothalamus des souris âgées (Jiang et al., 2001). Cette augmentation potentielle de l'activité mitochondriale respiratoire pourrait être associée à une augmentation de production des ROS hypothalamiques. Les travaux de Horvath et al. ont montré que les neurones POMC sont plus sensibles à l'accumulation chronique des ROS par rapport aux neurones NPY/AgRP dont le système de régulation des ROS fait intervenir en priorité l'oxydation des acides gras et l'UCP2 permettant une régulation constante des ROS (Horvath et al., 2009). Horvath a proposé un modèle selon lequel la stimulation répétée des neurones POMC en cas de balance énergétique positive et aussi au cours du vieillissement pourrait être associée à une accumulation chronique des ROS au niveau des neurones POMC, qui altérerait leur fonction. Une augmentation de l'expression des peroxysomes est également décrite au niveau cellulaire au cours du vieillissement (Titorenko et al., 2011), mais n'a pas encore été spécifiquement étudiée au niveau de l'hypothalamus ou au niveau des neurones POMC. De nombreuses études ont déjà montré des conséquences similaires de l'obésité ou du vieillissement sur le fonctionnement cellulaire, notamment au niveau du cerveau dans le domaine de la cognition (Hu et al., 2006). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des ROS, l'activité électrique des neurones POMC, le nombre de mitochondries et de peroxysomes au niveau des neurones POMC chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes, pour voir si les altérations potentielles des neurones POMC chez les souris obèses sont également observées chez les souris âgées.

Si les ROS interviennent dans le contrôle de la prise alimentaire en modulant des voies de signalisation intracellulaire au niveau des neurones POMC, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet anorexigène de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV restent néanmoins à préciser, notamment au niveau des neurones POMC.

**L'intégrité du complexe mTORC1 est nécessaire au niveau des neurones POMC à l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV et à l'augmentation de l'expression des ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC.**

De nombreuses voies de signalisation intracellulaires sont capables de moduler la production de ROS. L'activation des cytokines, l'insuline, l'hypoxie, l'augmentation des concentrations cytosoliques en Calcium et l'activation de la voie PI3K augmentent la production des ROSm (Krieger-Brauer et al., 1997) (May et de Haën, 1979). D'après (Dröge, 2002a), parmi les ROS, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est la principale forme de ROS qui constitue une molécule « signal » capable d'activer des voies intracellulaires en dehors du stress oxydant, car les autres ROS ont une durée de vie plus limitée en conditions physiologiques.

La voie PI3K peut à la fois activer les ROS, mais aussi mTORC1 (Dibble and Cantley, 2015). mTORC1 est impliqué dans la régulation de la respiration mitochondriale en favorisant la transcription des gènes mitochondriaux comme PGC-1 $\alpha$  et en activant la phosphorylation oxydative (Schieke et al., 2006). L'activation de la voie mTORC1, qui est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire, pourrait donc favoriser la production de ROS, notamment au niveau hypothalamique.

Notre travail identifie pour la première fois une interaction entre la voie mTORC1 et les ROS dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire.

Pour étudier l'interaction entre les ROS et mTORC1 au niveau hypothalamique, nous avons utilisé plusieurs approches. Nous avons d'abord montré que l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV induit une augmentation de la phosphorylation de S6K1 au niveau hypothalamique chez les souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard (**Figure 23**). Cette augmentation de la phosphorylation de S6K1 était observée 1h après l'injection, mais n'était plus présente 2h après l'injection (données non montrées), suggérant une activation brève de la voie mTORC1.

Puis nous avons étudié l'effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV chez les souris S6K1 KO, un modèle étudié notamment par Um et al. et caractérisé par une altération constitutive fonctionnelle de la voie

mTORC1. Les souris S6K1-KO présentent une diminution du poids corporel contrastant avec une prise alimentaire similaire par rapport aux souris S6K1-WT et sont résistantes à l'obésité induite par l'alimentation. Lorsque la prise alimentaire quotidienne est rapportée au poids corporel, elle est augmentée de 17% chez les S6K1-KO par rapport aux S6K1-WT. Il n'y a pas non plus de différence en terme de thermogénèse. Ces souris S6K1-KO présentent non seulement une résistance à l'obésité induite par l'alimentation mais aussi une résistance à l'augmentation physiologique du poids observée avec l'âge. Ces particularités pourraient s'expliquer par une augmentation du métabolisme basal. Des expériences montrent que les S6K1-KO consomment plus (27%) d'oxygène que les S6K1-WT en conditions d'alimentation standard et aussi en cas de régime HFD.

Chez les souris S6K1-KO nourries avec une alimentation standard, l'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'exerce plus d'effet anorexigène (**Figure 24**), alors que cet effet est retrouvé chez les S6K1-WT. Ces résultats suggèrent que l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV nécessite une protéine S6K1 fonctionnelle et donc l'intégrité de la voie mTORC1.

Nous avons également confirmé ces données en administrant de manière successive de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV, puis de la rapamycine ICV, un inhibiteur de mTORC1 et en montrant que la rapamycine est capable de diminuer l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV (**Figure 26**). Ainsi, nous montrons par une double approche, génétique et pharmacologique, que la diminution de la prise alimentaire induite par une administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV nécessite l'intégrité de la voie mTORC1.

Nous avons ensuite utilisé un second modèle animal, créé récemment par notre équipe, avec une altération fonctionnelle de la voie mTORC1 spécifiquement au niveau des neurones POMC. L'altération de la voie mTORC1 est secondaire à une altération du gène raptor, codant la protéine raptor dont l'intégrité est nécessaire à la formation et l'activité du complexe mTORC1. Le phénotype métabolique de ces souris est en cours de caractérisation. Il n'y a pas de différence significative en termes de prise alimentaire et de poids corporel chez les souris POMC-raptor-WT et -KO en conditions basales (accès libre à la nourriture et en l'absence de stimulation par un traitement). Ces observations concordent avec l'absence de variation de prise alimentaire et de poids corporel rapportée chez les souris avec une invalidation de la protéine S6K1 au niveau des neurones POMC et nourries avec une alimentation standard (Smith et al., 2015). Chez les souris POMC-raptor-KO, l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV n'exerce pas d'effet anorexigène (**Figure 27**) alors que ce même traitement entraîne une diminution significative de la prise alimentaire chez les souris POMC-raptor-WT. Ainsi, la

présence d'un complexe mTORC1 fonctionnel au niveau des neurones POMC est nécessaire à l'effet anorexigène de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il serait intéressant d'étudier l'effet d'une administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV chez les souris POMC-S6K1-KO pour voir si cet effet dépend également de la présence d'une protéine S6K1 fonctionnelle, spécifiquement au niveau des neurones à POMC.

Par ailleurs, en cas d'altération fonctionnelle du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV n'induit pas d'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC (**Figure 28**). Le complexe mTORC1 pourrait donc être impliqué dans la production locale des ROS au niveau des neurones POMC. Ce résultat est compatible avec l'hypothèse selon laquelle l'administration exogène aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV entrainerait une augmentation locale de ROS au niveau neuronal par un mécanisme indirect et non pas par pénétration intracellulaire de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène. La production intracellulaire de ROS étant principalement assurée par la phosphorylation oxydative, il serait aussi intéressant d'étudier la consommation hypothalamique en oxygène de ces souris POMC-raptor-KO. mTORC1 pourrait contrôler la production intracellulaire de ROS au niveau des neurones POMC, en augmentant la respiration mitochondriale et donc en augmentant la consommation d'oxygène et l'activité de l'ATP synthase au niveau des neurones POMC. Dans ce cas, la consommation hypothalamique d'oxygène pourrait être diminuée en conditions basales (en dehors de toute stimulation) chez les animaux POMC-raptor-KO par rapport aux animaux -WT. L'idéal serait de mesurer aussi la consommation d'oxygène spécifiquement au niveau des neurones POMC de ces animaux.

L'effet potentiel de la voie mTORC1 sur l'activation électrique des neurones POMC a déjà été étudié (Smith et al., 2015). Une altération fonctionnelle de la protéine S6K1 au niveau des neurones POMC entraine une altération de l'excitabilité des neurones POMC avec notamment une diminution du potentiel membranaire de repos et de la fréquence de décharge au niveau des neurones POMC en conditions de stimulation par le glucose. D'après nos résultats, l'intégrité du complexe mTORC1 étant nécessaire à l'augmentation des ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC, l'altération de l'activité électrique des neurones POMC chez les souris POMC-S6K1-KO pourrait également impliquer une diminution de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.



Ces résultats ont été obtenus en utilisant des modèles génétiquement modifiés avec altération constitutive de composés de la voie mTORC1 (S6K1, protéine effectrice de mTORC1 et raptor, protéine nécessaire à la fonction du complexe mTORC1). Etant donné l'existence de mécanismes compensateurs dans ce type de modèles génétiques, il aurait été intéressant d'étudier l'effet de la rapamycine sur l'augmentation de l'expression des ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC.

Nos résultats suggèrent qu'une augmentation aigue de ROS au niveau des neurones POMC dépendrait de l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC et entraînerait secondairement une diminution de la prise alimentaire, dans des conditions d'alimentation standard.

Les conséquences du vieillissement sur cette forme de régulation de la prise alimentaire impliquant à la fois mTORC1 et les ROS restent à évaluer au niveau des neurones POMC. Une augmentation de l'activité de mTORC1 est décrite au niveau des neurones POMC chez les souris âgées. Cette augmentation entraînerait une activation des canaux potassiques ATP sensibles qui inhiberait à son tour l'activité électrique des neurones POMC, augmentant la proportion de neurones POMC dits « silencieux » et favorisant une augmentation de la prise alimentaire et une prise de poids. Chez ces souris âgées, l'activité des neurones POMC est restaurée en cas de traitement par rapamycine pendant 3 semaines (Yang et al., 2012) alors que ce même traitement n'a aucun effet sur l'activité des neurones POMC chez les souris jeunes. D'après nos hypothèses précédemment développées, au cours du vieillissement, il est possible que l'activation prolongée et/ou excessive de la voie mTORC1 et donc une augmentation chronique de production des ROS au niveau des neurones POMC entraînent une altération des variations aigues de ROS qui semblent associées et nécessaires à une activation électrique des neurones POMC et à une diminution conséquente de la prise alimentaire.

### **La leptine augmente l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.**

Après avoir identifié le rôle de mTORC1 dans la régulation de la prise alimentaire induite par un ROS exogène ou un piègeur de ROS, nous avons recherché une interaction entre la leptine, activateur de mTORC1, et les ROS dans la régulation de la prise alimentaire.

Nos données précédentes résultent de l'étude de variations de ROS hypothalamiques induites pharmacologiquement par l'administration exogène aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'honokiol, un piègeur de ROS, qui ne rendent pas nécessairement compte de la réalité physiologique.

D'après nos hypothèses, une augmentation de ROS au niveau des neurones POMC est impliquée dans l'activation des neurones POMC permettant ainsi une diminution de la prise alimentaire. L'effet anorexigène de la leptine pourrait également entraîner une augmentation de ROS au niveau des neurones POMC. Dans cette perspective, il nous est apparu important d'aborder les rapports potentiels entre les ROS et la leptine.

Le rôle physiologique de la leptine dans l'homéostasie de la balance énergétique n'est plus à démontrer. La leptine recrute de nombreux relais neuronaux et voies de signalisation intracellulaire pour médier son action au niveau hypothalamique avec notamment mTORC1 et STAT3 (Varela and Horvath, 2012). Les neurones POMC sont essentiels à l'action de la leptine au niveau central. La leptine active par dépolarisation les neurones POMC (Cowley et al., 2001). Diano et al. ont mis en évidence une corrélation entre la leptinémie et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC chez les souris minces, mais pas chez les souris obèses nourries avec un régime HFD.

Nos résultats montrent pour la première fois *in vivo* que la leptine ICV entraîne une augmentation significative de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.

Nous avons utilisé la plus petite dose de leptine avec un effet anorexigène chez les souris C57Bl6J d'après nos expériences de dose/réponse. Nous avons montré que la dose 2,5 µg/µL ICV 1µL/souris avait exactement le même effet sur la prise alimentaire et le poids corporel que la dose 2,5 mg/kg IP 0,1 mL/souris (données non présentées). Nous avons choisi d'étudier l'effet de la leptine sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC par injection aigue ICV plutôt que par injection IP pour étudier l'action centrale de la leptine sur les neurones POMC et pour utiliser le même protocole d'étude du DHE qu'en cas d'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Une interaction similaire a déjà été décrite *in vitro* au niveau de cultures cellulaires hypothalamiques par Palomba et al. (Palomba et al., 2015). Dans ce travail, l'effet de la leptine sur l'augmentation des ROS est inhibé par les endocannabinoïdes et par PPAR $\gamma$ . Un lien entre les PPAR $\gamma$  et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC a aussi été décrit par Diano et al. chez des souris minces nourries avec un régime HFD pendant 5 jours (Diano et al., 2011). Un traitement de 7 jours par agoniste de PPAR $\gamma$  entraîne une augmentation du nombre de peroxyosomes au niveau des neurones POMC, associée à une diminution de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC et une augmentation de la prise alimentaire chez les souris minces nourries avec un régime HFD pendant 5 jours. Chez les

souris obèses DIO, un traitement par antagoniste de PPAR $\gamma$  entraîne une diminution du nombre de peroxysomes, associée à une augmentation des ROS au niveau des neurones POMC et une diminution de la prise alimentaire. De plus, le blocage central de PPAR $\gamma$  par des antagonistes pharmacologiques permet de restaurer la sensibilité à la leptine chez les rats obèses nourris avec un régime HFD (Ryan et al., 2011). Ainsi, d'après nos résultats et les données de la littérature, en cas d'obésité induite par l'alimentation, la résistance à la leptine pourrait être liée à une activation hypothalamique de PPAR $\gamma$  qui inhiberait la production de ROS au niveau des neurones POMC induite par la leptine, diminuant ainsi l'activité électrique des neurones POMC et favorisant la prise alimentaire et la prise pondérale.

### **L'effet anorexigène de la leptine dépend d'une augmentation des ROS au niveau hypothalamique.**

L'administration aigue d'honokiol ICV entraîne une diminution significative de l'effet anorexigène induit par la leptine chez les souris C57Bl6J. Une augmentation hypothalamique des ROS paraît donc nécessaire à l'effet anorexigène de la leptine. Nos données sont à rapprocher des études de culture de cellules mammaires néoplasiques qui ont déjà décrit une action inhibitrice *in vitro* de l'honokiol sur la croissance cellulaire induite par la leptine (Avtanski et al., 2015). Il est intéressant de remarquer que ce mécanisme impliquerait notamment la protéine S6K1 ainsi que STAT3 (Nagalingam et al., 2012). Ceci suggère donc, dans un modèle et un paradigme très différent des nôtres, l'existence d'une cascade de signalisation impliquant à la fois la leptine, les ROS et mTORC1 (S6K1) dans la régulation de la prolifération cellulaire dans des conditions pathologiques (cancer). Il aurait été intéressant d'étudier les effets de l'administration conjointe d'honokiol et de leptine sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC pour voir si l'honokiol inhibe l'augmentation des ROS induite par la leptine au niveau des neurones POMC.

Après avoir montré que la leptine augmente l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intracellulaires potentiellement responsables de cette augmentation de ROS. Etant donné que la principale source de ROS intracellulaire est d'origine mitochondriale par la phosphorylation oxydative, nous avons étudié l'effet de la leptine ICV sur la consommation hypothalamique en oxygène. La leptine diminue l'effet de l'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, sur la respiration mitochondriale hypothalamique. Ces résultats montrent que la leptine ICV modifie la respiration mitochondriale au niveau hypothalamique et augmente la consommation

d'oxygène non dépendante de l'ATP synthase. Ceci évoque un découplage mitochondrial, qui pourrait être favorisé par les ROS. En effet, il a été montré que les ROS produits lors de la phosphorylation oxydative peuvent entraîner une augmentation de l'activité d'UCP2, qui permet le découplage mitochondrial et ainsi une diminution de production des ROS, selon un mécanisme de rétro-contrôle (Toda and Diano, 2014). L'effet de la leptine sur la respiration mitochondriale hypothalamique n'avait jamais été décrit au niveau hypothalamique chez des souris nourries avec une alimentation standard.

Ces résultats sont cohérents avec ce qui est décrit dans la littérature au niveau des organes périphériques chez les souris déficientes en leptine. Chez les souris ob/ob, une diminution de la respiration mitochondriale est observée au niveau du foie et du tissu adipeux (Holmström et al., 2013). Le traitement de ces souris par leptine permet d'augmenter et de restaurer la respiration mitochondriale au niveau hépatique. Il serait intéressant de comparer la consommation d'oxygène au niveau hypothalamique des souris ob/ob par rapport aux souris sauvages, mais aussi d'étudier celle des souris C57Bl6J obèses nourries avec un régime HFD par rapport aux souris avec un poids normal et une alimentation standard afin de se rapprocher de la physiopathologie de l'obésité chez les humains. Chez des souris C57Bl6J obèses, nourries avec un régime HFD et développant une résistance à la leptine, il est possible que la consommation hypothalamique d'oxygène soit diminuée par rapport aux animaux non obèses, de la même manière que l'expression des ROS paraît altérée au niveau des neurones POMC en cas d'obésité induite par l'alimentation.

### **La leptine nécessite l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC pour augmenter l'expression des ROS et exercer son effet anorexigène.**

La leptine augmente la phosphorylation de S6K1 et S6 dans le noyau arqué, le VMN et le PVN, mais ne module pas S6K1 au niveau de l'hippocampe, du cortex et du tronc cérébral (Harlan et al., 2013). La rapamycine ICV inhibe l'effet anorexigène de la leptine en bloquant l'activation de mTORC1 au niveau hypothalamique (Cota et al., 2006). De même, les souris S6K1-KO sont résistantes à l'effet anorexigène de la leptine (Cota et al., 2008). La majorité de ces études ne précisent cependant pas la population neuronale impliquée, c'est pourquoi nous avons cherché à étudier le rôle du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC dans la régulation de la prise alimentaire induite par la leptine.

Nos résultats montrent que la leptine n'exerce plus son effet anorexigène chez les souris POMC-raptor-KO, qui présentent un complexe mTORC1 défectueux spécifiquement au niveau des neurones POMC. Ainsi, nous montrons que le complexe mTORC1 est impliqué au niveau des neurones POMC dans la régulation de la prise alimentaire induite par la leptine. Le rôle de la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC est encore peu connu. Chez les souris POMC-S6K1-KO, aucune altération de la dépolarisation des neurones POMC ou de l'effet anorexigène induits par la leptine n'est observée (Smith et al., 2015) ce qui suggère que l'effet de la leptine sur l'activité électrique des neurones POMC et la prise alimentaire ne nécessiterait pas une protéine S6K1 fonctionnelle au niveau des neurones POMC. De manière intéressante, nos travaux nuancent les résultats de cette étude en suggérant que l'effet de la leptine sur la prise alimentaire et sur l'augmentation de ROS au niveau des neurones POMC nécessite l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC. Ainsi, cela impliquerait que la leptine active le complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC pour moduler l'expression des ROS et pour diminuer la prise alimentaire, mais cette interaction serait indépendante de la protéine S6K1, une des protéines effectrices principales de mTORC1. Ces effets pourraient être médiés par l'activation d'autres protéines ou voies de signalisation intracellulaire. Cette hypothèse est cohérente avec les données de la littérature sur la modulation de l'activité mitochondriale et la biogénèse mitochondriale induites par la voie mTORC1 qui semble impliquer 4<sup>E</sup>-BP, l'autre protéine effectrice principale de mTORC1 (Morita et al., 2013). Le complexe mTORC1 pourrait également moduler l'expression du gène PGC-1 $\alpha$ , facteur de biogénèse mitochondriale (Cornu et al., 2014) au niveau hépatique. Une étude a identifié une corrélation entre le niveau de formation du complexe mTOR/raptor et l'activité mitochondriale et a montré que cette modulation était indépendante de S6K1 (Schieke et al., 2006). Ces données concordent avec l'implication potentielle du complexe mTORC1 et non de la protéine S6K1 au niveau des neurones POMC dans l'effet de la leptine sur la prise alimentaire. Les ROS pourraient être impliqués dans ce processus. La leptine pourrait activer le complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC, ce qui entraînerait une augmentation de la production mitochondriale de ROS, indépendamment de la protéine S6K1, favorisant ensuite l'activité électrique des neurones POMC par un mécanisme encore inconnu. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la leptine sur l'activité électrique des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-KO.

Pourtant, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 23**) et la leptine (Cota et al., 2008) ne sont pas capables d'exercer d'effet anorexigène en cas d'altération constitutive globale de S6K1, chez les souris S6K1-KO ou en cas de traitement concomitant par rapamycine, inhibiteur de mTORC1 (**Figure 26**

et Cota et al., 2006). Il s'agit très probablement d'une régulation complexe qui pourrait impliquer le complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC et/ou la protéine S6K1 au niveau d'une autre population neuronale ou d'un autre noyau hypothalamique ou encore d'une zone extra-hypothalamique.

Un autre modèle animal avec une activation constitutive de mTORC1 secondaire à une délétion de TSC1, inhibiteur du complexe mTORC1, au niveau des neurones POMC existe. Ces souris POMC-TSC1-KO sont caractérisées par une obésité et une hyperphagie. Chez ces souris POMC-TSC1-KO, l'effet inhibiteur de la leptine sur la prise alimentaire et le poids corporel est diminué et associé à une augmentation très significative de la leptinémie par rapport aux animaux -WT (Mori et al., 2009). Un traitement chronique par rapamycine permet de normaliser les paramètres métaboliques de ces souris, y compris la leptinémie. Ces différentes données montrent combien l'effet d'une molécule ou d'une voie de signalisation intracellulaire peut varier selon la nature et la durée du stimulus. Une stimulation aigue ou chronique des ROS et de la voie mTORC1 pourrait ainsi entraîner des effets différents sur la prise alimentaire.

L'absence d'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC en réponse à la leptine chez les souris POMC-raptor-KO est particulièrement intéressante. Elle confirme que l'effet anorexigène de la leptine dépend non seulement d'une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC, mais aussi que celle-ci dépend de l'activation du complexe mTORC1 au niveau de ces mêmes neurones. Le traitement par leptine IP entraîne une augmentation significative de l'expression de phospho-S6 et de STAT3 au niveau des neurones POMC chez les souris nourries avec un régime standard (Reed et al., 2010), effets associés à une augmentation de l'activité électrique des neurones POMC. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la leptine sur la phosphorylation de STAT3 des neurones POMC chez les souris POMC-raptor-KO pour voir si l'effet de la leptine sur STAT3 dépend du complexe mTORC1.

Chez les souris obèses (DIO) résistantes à la leptine, l'administration aigue ICV d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restaure l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 induite par la leptine et l'activation des neurones POMC (Diano et al., 2011).

D'après ces différents éléments, la cascade de signalisation intracellulaire suivante pourrait être envisagée : la leptine pourrait activer le complexe mTORC1, qui augmenterait la respiration mitochondriale, aboutissant à la formation de ROS, qui pourrait entraîner secondairement l'activation électrique des neurones POMC. Ce mécanisme d'activation des neurones POMC pourrait impliquer une augmentation du calcium intracellulaire (Gyengesi et al., 2012), une activation des canaux potassiques ATP dépendants (Parton et al., 2007) ou encore la protéine STAT3.

Notre travail montre que l'effet central de la leptine sur la prise alimentaire implique plusieurs messagers de signalisation intracellulaire interdépendants au niveau des neurones POMC dont le complexe mTORC1 et les ROS. Au vu de ces résultats, une proposition de modèle de signalisation intracellulaire de la leptine au niveau des neurones POMC dans des conditions d'alimentation standard et chez des souris non obèses est illustrée **Figure 34**.

D'après nos résultats, la leptine agirait au niveau des neurones POMC en activant une voie de signalisation qui recruterait le complexe mTORC1 et aboutirait à une augmentation intracellulaire de ROS, possiblement par augmentation de la respiration mitochondriale. Cette production locale de ROS pourrait ensuite activer sur le plan électrique les neurones POMC selon un mécanisme à explorer, et favoriser une diminution de la prise alimentaire.

## . **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La régulation hypothalamique/centrale de la prise alimentaire est un processus complexe qui fait intervenir à la fois les hormones et les nutriments d'origine périphérique, reflétant le statut énergétique de l'organisme, les noyaux hypothalamiques comme le noyau arqué, le PVN et le VMN différents types de neurones comme les neurones POMC et les neurones NPY/AgRP, mais aussi de nombreuses molécules et voies de signalisation intracellulaire.

Ces différentes voies de signalisation sont étroitement liées, témoignant d'interactions variées. L'activation ou l'inactivation d'une voie dépend du type de signal, de la durée du stimulus, de la disponibilité et de la nature des nutriments, des besoins énergétiques de l'organisme, du type de cellule et du type de noyau hypothalamique.

L'implication de la voie mTORC1 hypothalamique dans la régulation de la prise alimentaire est une des thématiques privilégiées de notre laboratoire. L'inhibition pharmacologique centrale et aigue de mTORC1 par la rapamycine entraîne une diminution de la prise alimentaire et inhibe l'effet anorexigène de la leptine (Cota et al., 2006). Le rôle de mTORC1 au niveau des neurones POMC est moins bien connu. Le défaut de fonction de la protéine S6K1, effectrice de mTORC1, au niveau des neurones POMC est associée à une hyperphagie, une obésité et une altération de l'activité neuronale POMC (Smith et al., 2015). Une activation chronique et excessive de mTORC1 au niveau des neurones POMC a été décrite lors du vieillissement, associée à une diminution de l'activité électrique neuronale POMC et à une réduction des projections neuronales vers le PVN (Yang et al., 2012), corrigée par l'administration de rapamycine (Mori et al., 2009). Néanmoins, l'implication de la voie mTORC1 au niveau des neurones POMC reste à préciser. Son effet sur la prise alimentaire semble varier selon les conditions d'activation (aigue vs chronique ; stimulation par la leptine ou inhibition par la rapamycine ; rôle potentiellement différent de mTORC1 et de S6K1 ; possible existence de différentes sous populations de neurones POMC).

Le rôle potentiel des ROS hypothalamiques dans la régulation centrale de la balance énergétique est étudié principalement par l'équipe de Diano, Horvath, Andrews et al. et par l'équipe française Dijonnaise de Leloup, Penicaud, Benani et al. L'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV entraîne l'activation électrique des neurones POMC (Diano et al., 2011). Les nutriments comme le glucose (Leloup et al., 2006) ou les lipides (Benani et al., 2007) et les



hormones comme la ghréline (Andrews et al., 2008) et l'insuline (Jaillard et al., 2009) modulent les ROS hypothalamiques. Cette modulation de ROS est nécessaire au contrôle central de la prise alimentaire. Une corrélation entre la leptinémie et l'expression des ROS au niveau des neurones POMC est observée chez les souris avec un poids normal, mais cette corrélation disparaît en cas de régime riche en graisses (Diano et al., 2011).

Nos travaux montrent qu'une augmentation centrale, aiguë, de ROS exogènes par voie ICV, entraîne une augmentation de ROS au niveau des neurones POMC, une activation des neurones du noyau arqué et une diminution de la prise alimentaire chez des souris C57Bl6J nourries avec une alimentation standard. Le caractère ponctuel et l'origine exacte de cette augmentation de ROS (augmentation de production mitochondriale ; diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes ; transfert intracellulaire de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injecté) restent à prouver. Nous aurions pu également étudier la cinétique de l'effet aigu de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV sur l'expression du DHE au niveau des neurones POMC en sacrifiant les animaux 24 à 48h après l'injection d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour voir si l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC disparaît à 24h ou 48h, montrant qu'il s'agit bien d'une augmentation brève et ponctuelle des ROS au niveau des neurones POMC.

De plus, il serait intéressant de comparer l'expression du DHE dans les neurones POMC de souris minces avec celle de souris obèses nourries avec une alimentation HFD, en conditions de privation de nourriture et après un repas. Diano a montré qu'il existe une diminution de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC lors du jeûne et au contraire une augmentation des ROS lors de la reprise alimentaire. Étant donné que l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris obèses est similaire à celle des animaux minces alors que la leptinémie est augmentée et l'activité électrique POMC diminuée (50% des neurones POMC sont silencieux), une dérégulation des ROS en réponse à un excès chronique de nutriments est possible au niveau des neurones POMC. Ce phénomène pourrait être impliqué dans la résistance à la leptine associée à l'obésité. Les conséquences de l'obésité induite par l'alimentation sur la production hypothalamique des ROS restent donc à explorer.

D'autre part, nous avons pu montré l'implication de mTORC1 au niveau des neurones POMC dans la diminution de la prise alimentaire et dans l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC induits par l'administration aiguë d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV. Une telle interaction n'avait encore jamais été décrite au niveau hypothalamique et au niveau des neurones POMC du noyau arqué. L'étude de la phosphorylation de S6 au niveau des neurones

POMC en réponse à un traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou Saline a été réalisée chez des souris C57Bl6J, puis chez des souris POMC-YFP (*données non montrées*). En raison de problèmes techniques liés à la double immunofluorescence phospho-S6 et POMC (les 2 anticorps sont dirigés contre des anticorps de lapin), nous n'avons pas été en mesure de quantifier et de colocaliser les 2 signaux pour le moment. Dès que ces difficultés techniques seront résolues, cette expérience complémentaire sera finalisée pour compléter nos résultats actuels. Il serait intéressant de comparer l'expression des ROS et l'expression de phospho-S6 au niveau des neurones POMC de souris traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV ou par son véhicule, à la recherche d'une corrélation entre l'expression des ROS et la phosphorylation de S6 au niveau des neurones POMC. Enfin, la population neuronale POMC est hétérogène, notamment en terme de types de récepteurs membranaires aux hormones, de transporteurs du glucose et de neurotransmetteurs (Hentges et al., 2009). La caractérisation du sous-type de neurone POMC sensible au ROS reste à déterminer.

Nous avons aussi identifié pour la première fois *in vivo* un nouvel acteur intracellulaire, les ROS, dans la régulation de la prise alimentaire induite la leptine au niveau des neurones POMC. La leptine entraîne une augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC. Le blocage central des ROS par une administration aigue d'honokiol ICV diminue significativement l'effet anorexigène de la leptine, suggérant que cette augmentation locale de ROS soit nécessaire à l'effet anorexigène de la leptine. Il serait intéressant de montrer l'effet inhibiteur de l'honokiol ICV sur l'augmentation de l'expression des ROS induite par la leptine au niveau des neurones POMC.

Le mécanisme d'action de la leptine sur l'expression des ROS reste également à préciser. L'augmentation de la consommation hypothalamique d'oxygène en réponse à l'administration d'oligomycine par la leptine, pourrait être compatible avec une augmentation du découplage mitochondrial, qui pourrait être le témoin d'une augmentation locale de production de ROS. La mesure de l'expression d'UCP2 au niveau des neurones POMC en réponse à la leptine pourrait apporter des éléments de réponse sur l'éventuelle implication d'UCP2 dans ce processus. Nous avons tenté d'étudier les effets d'un inhibiteur d'UCP2 sur la consommation en oxygène hypothalamique de souris traitées ICV par leptine ou par PBS *in vivo*, mais les résultats préliminaires ne permettent pas de conclure et nécessitent des mises au point supplémentaires. D'autres acteurs des voies de signalisation intracellulaire pourraient

également être impliqués dans ce processus comme PPAR $\gamma$  ou les endocannabinoïdes (Palomba et al., 2015) et pourraient donner lieu à de nouveaux travaux de recherche.

De plus, nos résultats montrent que l'effet anorexigène de la leptine ainsi que l'augmentation de l'expression des ROS au niveau des neurones POMC nécessitent l'intégrité du complexe mTORC1 au niveau des neurones POMC.

La rapamycine, inhibiteur de mTORC1, est capable de bloquer l'effet anorexigène de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV (**Figure 25**) et de la leptine (Cota et al., 2006). Nous avons essayé d'étudier les conséquences du blocage central de mTOR par la rapamycine ICV sur l'expression du DHE au niveau des neurones POMC pour voir si la rapamycine est capable d'inhiber l'expression des ROS au niveau des neurones POMC de souris alimentées avec un régime standard. Aucune différence n'a été observée dans les conditions testées (administration de la rapamycine selon le même protocole que pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, données non montrées). Il serait intéressant d'étudier l'effet de la co-administration de rapamycine et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de leptine ICV sur l'expression des ROS au niveau des neurones POMC.

La souche de souris POMC-raptor-KO a été créée récemment par notre équipe et est actuellement en cours de caractérisation. Des données préliminaires du laboratoire montrent que l'expression de raptor est effectivement diminuée au niveau des neurones POMC des souris POMC-raptor-KO par rapport aux -WT et que l'effet orexigène de la rapamycine ICV n'est pas observé chez les POMC-raptor-KO par rapport aux -WT (données non publiées). Une corrélation entre le niveau de formation du complexe mTORC1 et l'activité mitochondriale a déjà été décrite (Schieke et al., 2006). Le nombre de mitochondries et de peroxyosomes, reflet indirect de la production et du métabolisme des ROS, chez les souris POMC-raptor-WT et -KO en réponse à la leptine, pourrait également être mesuré comme dans Diano et al. 2011. Ces résultats suggèrent l'implication du complexe mTORC1 en amont de la production de ROS dans la voie de signalisation intracellulaire activée par la leptine au niveau des neurones POMC. Le sens de cette interaction nécessite néanmoins des expériences complémentaires, en particulier neuroanatomiques. Il serait par exemple utile d'étudier l'effet de l'administration aigue d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'honokiol ICV sur la phosphorylation de S6 au niveau des neurones POMC. L'implication potentielle de STAT3 dans cette régulation intracellulaire constituerait aussi une piste de recherche intéressante pour mieux comprendre les modalités d'action de la leptine et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ICV au niveau des neurones POMC.

Enfin, ces différents intermédiaires intracellulaires de l'effet anorexigène de la leptine au niveau hypothalamique ont été étudiés ici exclusivement dans des conditions d'alimentation standard chez des souris avec un poids normal. Les conséquences d'une obésité induite par une alimentation riche en graisses sur l'expression de la voie mTORC1 et des ROS au niveau des neurones POMC permettraient d'améliorer la compréhension du phénomène de résistance à la leptine, associé à l'obésité, à la fois chez les rongeurs et chez les humains.

La majorité des expériences réalisées dans le cadre de cette thèse s'intègre dans une démarche mécanistique. Elle inclut à la fois des expériences *in vivo* d'étude de la prise alimentaire et du poids corporel et des études neuroanatomiques essentiellement sous la forme des mesures d'expression des ROS au niveau des neurones POMC. Les neurones POMC semblent particulièrement sensibles aux variations de ROS (Horvath et al., 2009) et une altération de ces neurones est décrite au cours du vieillissement (Yang et al., 2012) et en cas d'obésité induite par l'alimentation (Diano et al., 2011). Sur le plan thérapeutique, ces neurones pourraient constituer une cible intéressante chez les sujets obèses. La restauration de la sensibilité à la leptine permettrait de rétablir la fonction des neurones POMC en cas d'obésité, favorisant une diminution de la prise alimentaire en cas de balance énergétique positive.

## **. ANNEXES**

### **ANNEXE 1 :**

**Effets métaboliques de l'inhibition pharmacologique de Jak / STAT chez les souris**

### **ANNEXE 2 (publication 1):**

**Normotensive incidentally discovered pheochromocytomas display specific biochemical, cellular and molecular characteristics**

### **ANNEXE 3 (publication 2):**

**Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis**

### **ANNEXE 4 (publication 3):**

**Actualités du syndrome de Cushing d'origine surrénalienne**

### **ANNEXE 5 (publication 4):**

**Per-operative Hemodynamic Instability in normotensive patients with incidentally discovered pheochromocytomas**

### **ANNEXE 6 (publication 5):**

**Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors and mTORC1 signalling pathway interact to modulate glucose homeostasis**

### **ANNEXE 7 (publication 6):**

**Etiopathogeny of primary adrenal hypercortisolism**

## **Effets métaboliques de l'inhibition pharmacologique de Jak/STAT chez les souris C57BL6J**

**Ce travail a été réalisé dans le cadre du Groupe des Tumeurs Neuroendocrines.**

**Les inhibiteurs de Jak, utilisés chez les patients avec une myélofibrose, sont associés à une prise pondérale inhabituelle au cours du traitement. Nous avons voulu explorer cet effet en étudiant les effets aigus et chroniques d'un inhibiteur de Jak 2 sur la balance énergétique.**

### **RESUME**

La voie de signalisation Jak/STAT (Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription) joue un rôle physiologique important dans la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'immunité. Des données de la littérature suggèrent son implication potentielle dans la régulation de la balance énergétique.

**Objectifs :** Le but de notre étude était d'étudier les effets de l'administration aiguë et chronique, centrale et périphérique, d'un inhibiteur de Jak 2 sur le métabolisme énergétique.

**Méthodologie :** Des souris C57BL6J ont reçu des injections intra-cérébro-ventriculaires (ICV) et intra-péritonéales (IP), aiguës et chroniques, d'un inhibiteur de Jak 2 ou de son contrôle (DMSO) avec évaluation régulière du poids corporel et de la prise alimentaire. Une analyse de la composition corporelle a été réalisée au début et à la fin de chaque expérimentation chronique. Dans un deuxième temps, l'inhibiteur de Jak 2 a été administré de manière concomitante à la leptine afin d'évaluer son effet sur la signalisation de la leptine.

**Résultats :** L'administration aiguë ICV de l'inhibiteur de Jak 2 à 3,12 µg/injection induit une augmentation de la prise alimentaire ( $p < 0.001$ ) et du poids ( $p = 0.0018$ ) à 24h. L'administration aiguë IP de l'inhibiteur de Jak 2 (0,05mg/injection) induit une augmentation de la prise alimentaire à 1h ( $p = 0,006$ ), 2h ( $p = 0,016$ ) et 4h ( $p = 0,035$ ) sans modification du poids.

L'administration chronique, IP et ICV, entraîne une augmentation de la masse grasse statistiquement significative après administration chronique ICV (1 fois par semaine pendant 3 semaines) de l'inhibiteur de Jak 2 3,12 µg ( $p = 0,008$ ) et après administration IP 2 fois par jour (0,03mg) ( $p = 0,037$ ), lors de régime standard.

La diminution de la prise alimentaire et du poids induite par la leptine et l' $H_2O_2$  ICV n'est plus observée en cas de co-administration avec une dose d'inhibiteur de Jak 2 ICV non active sur la prise alimentaire.

**Conclusion :** L'inhibiteur de Jak 2 exerce un effet orexigène chez les souris en régime standard en cas d'administration aiguë, centrale ou périphérique, mais cet effet n'est pas retrouvé en cas d'administration chronique. Une élévation de la masse grasse, sous régime standard, est observée après administration chronique ICV hebdomadaire ou IP 2 fois/jour. Ces résultats confirment l'implication potentielle directe de Jak 2 dans la régulation de la balance énergétique. Des études non publiées dans le laboratoire montrent que la leptine induit une augmentation des ROS au niveau des neurones POMC et que cette élévation est nécessaire à son signal anorexigène. Jak 2 semble moduler l'effet anorexigène de la leptine et de l' $H_2O_2$  ICV. Des études complémentaires devront éclaircir son rôle dans la régulation de l'activité neuronale et de l'expression des ROS au niveau des cellules POMC.

## **Impact of a Jak 2 inhibitor on energy metabolism.**

Magalie Haissaguerre, Amandine Ferrière, Nicolas Saucisse, Antoine Tabarin, Daniela Cota  
INSERM U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France

### **Background**

The hypothalamus is one of the main brain regions involved in the regulation of energy balance. Two subsets of neurons have been identified within the arcuate nucleus that have opposite effects on feeding : POMC/CART neurons (Pro-Opio-Melanocortin and Cocaine-amphetamine-regulated-transcript) whose activation produces an anorectic effect, and NPY/AgRP neurons (Neuropeptide Y/ Agouti-Related-Peptide) which on activation produce an orexigenic effect (1). These neurons integrate fuel availability with signals mediated by hormones such as leptin or nutrients. However, the intracellular signaling pathways involved in this process remain poorly understood.

A key player that conveys information regarding peripheral energy stores to the brain is the adipocyte-derived hormone leptin. Leptin circulates in direct proportion to stored body fat, enters the CNS in proportion to its circulating plasma level, and acts on its receptor expressed in key brain areas to regulate food intake and energy expenditure. Like other members of the class I cytokine family, the leptin receptor has been demonstrated to activate the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (Jak-STAT) pathway. Morton and al. (2) have shown that the effect of intra-VTA leptin administration to reduce food intake and body weight was mediated predominantly through Jak-2 signaling.

In addition to having an important role in host defense and autoimmunity, the JAKs also play a critical role in hematological cancers (3) and a deregulation of the Jak/STAT pathway has been shown to be involved in several pathologies. Thus, a new class of Jak inhibitors have been developed. Examples being, Tofacitinib a Jak 3 and Jak 1 inhibitor used in the treatment of rheumatoid polyarthritis (4) and Ruxolitinib a Jak 1 and Jak 2 inhibitor recently evaluated for the treatment of myelofibrosis . These targeted therapies lead to several adverse effects and among these, one is remarkable: an increase in body weight is observed in patients treated with the Jak 1 and Jak 2 inhibitor (Ruxolitinib) (5) for myelofibrosis and this increase was higher in patients with a BMI < 22.5 kg/m<sup>2</sup> at the beginning of the treatment. After 1 year of treatment, patients showed a mean increase of 6.6 to 9.4 kg in body weight.

These metabolic effects could be associated with anti-tumoral efficiency and an improvement in the quality of life. An other explanation could be that Jak 2 is directly involved in the regulation of energy balance and metabolism and that inhibition of Jak 2 could have a specific orexigenic effect.

### **Objectives**

Due to the secondary metabolic effects described in patients treated with Jak inhibitors, our first goal was to study the potent effects of a specific Jak 2 inhibitor on energy balance. We studied the effect of acute and chronic, central and peripheral, administration of this inhibitor on food intake, body weight, fat mass and energy expenditure. We also proposed to determine the effect of the Jak 2 inhibitor on the anorexigenic effect induced by leptin and by a hypothalamic increase in ROS levels (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **Materiel & Methods**

### **Animals**

The experiments were conducted in strict compliance with European Union Directives (2010/63/EU) and were approved by the local ethical committee of the University of Bordeaux (animal experimentation authorization number n°01850.01). Maximal efforts were made to reduce the suffering and the number of animals used. This study involved 2-to 3- month-old- male C57BL/6J mice purchased from Janvier Labs (53941, Saint-Berthevin, France). All mice were housed individually 1-2 weeks before experiments with chow-food (Standard Rodent Diet A03, 3.2 Kcal/g; SAFE, Augy, France) or 40% High Fat Diet (HFD) and water ad libitum under a 12h light/dark cycle (lights on at 01:00 hours) unless otherwise specified and in a temperature-controlled room ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). At the end of the behavioral experiments and for tissue collection, mice were killed by cervical dislocation or by intracardiac perfusion for further analysis. The number of animals used for each experiment is detailed in the figure legends.

### **Drugs**

#### *Jak 2 inhibitor*

NVP\_BSK805 is a potent and selective ATP-competitive inhibitor of JAK 2 that does not cross the blood-brain barrier.

NVP\_BSK805 displays more than 20-fold selectivity towards JAK 2 in vitro, as well as excellent selectivity in broader kinase profiling.

#### *Leptin*

Recombinant leptin was provided by Dr A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA).

#### *H2O2*

H2O2 was prepared from a solution of H2O2 30% (Sigma-Aldrich inc, MO., USA) dissolved in NaCl.

### **Neurosurgery**

#### *Intra-Cérébro-Ventricular Cannulation*

Using a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, USA), mice were implanted with a cannula under ketamine and xylazine anesthesia (0.01 mL/g body weight of a mixture of 2 mL of 5% ketamine, 0.5 mL of 2% xylazine and 7.5 mL saline) and buprenorphine analgesia (0.1 mL/mouse). Cannulas were placed into the lateral cerebral ventricle (AP – 0.5mm from bregma, L – 1.2mm and DV – 2.1mm below skull) (6).

One week after surgery, an internal injector was inserted into the implanted cannula (projecting 1mm below the tip), connected via polyethylene tubing to a 25  $\mu\text{L}$  Hamilton syringe. The different drugs used (see below) were slowly injected by an automatic pump (Harvard apparatus, UK) at a rate of 10 000  $\mu\text{L}/\text{mn}$  and a volume of 1 or 2  $\mu\text{L}$  of drug/injection. The correct placement of the cannula was afterward confirmed by administering 5  $\mu\text{g}$  of the well-known potent orexigenic peptide neuropeptide Y (NPY) (Phoenix Pharmaceuticals Inc, France) in 1  $\mu\text{L}$  of 0.9% physiological saline. The cannulas were judged correctly placed if the mice ate a minimum of 0.5 g of chow within 2h after the administration of NPY. Mice that failed to respond correctly to the NPY test were removed from the study.

#### *ICV cannulation and minipump implantation*



ICV cannulation and minipump implantation were performed in a single surgical procedure.

Using a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, USA), mice were implanted with a cannula under ketamine and xylazine anesthesia (0.01 mL/g body weight of a mixture of 2 mL of 5% ketamine, 0.5 mL of 2% xylazine and 7.5 mL saline) and buprenorphine analgesia (0.1 mL/mouse). Cannulas were placed into the lateral cerebral ventricle (AP – 0.3mm from bregma, L – 1.0mm and DV – 2.5mm below skull) (7) .

The cannula was connected to an osmotic minipump (model 1004, Alzet, Cupertino, CA) via a 120 mm long vinyl tubing (inner diameter 0.69 mm +/- 0.08, Amzet Brain Infusion Kit 3) filled with artificial cerebrospinal fluid (aCSF, Tocris Bioscience, Europe). This length was chosen to allow 3 days of aCSF infusion after the surgery before the pump content reached the ventric-

ular system. Each minipump was filled either with vehicle solution alone [DMSO 50%, (Dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich.co, MO, USA) in aCSF) or vehicle solution containing Jak 2 inhibitor (filled in DMSO 50% and aCSF 50%).

### **Glucose tolerance test (GTT) and Insuline tolerance tests (ITT)**

The IGT and GTT were performed as previously described in by Ayala in Disease Models and Mechanisms 2010 (8). Blood glucose was assayed in tail blood using a glucometer (One Touch Vita, Lifescan) were taken at the onset of the light cycle between 9h and 10h am. The insulin dose used for intraperitoneal injections was 0.5 U/kg BW. Glucose dose used for intraperitoneal injections was 2 g/kg BW.

### **Body composition**

Body composition was measured by nuclear magnetic resonance (NMR) (IRM, Echo MRI 900, EchoMedical Systems, Houston, TX, USA) as described in Cardinal et al., 2014 (9).

### **Indirect calorimetry:**

Mice were individually housed in metabolic chambers (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) in which fluid, food intake, in-cage locomotor activity, and gas exchange could be monitored. After 72h of acclimatization, O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production were measured four times every 60 mn for a total of 24h to measure the gas exchange, respiratory quotient (RQ) and energy expenditure. Energy expenditure values were normalized to the body weight of the animals. Food and water intake were measured continuously by integration of scales inside the sealed cage environment. Simultaneously, home-cage locomotor activity was determined using a tridimensional infra-red light beam system. Total locomotor activity was expressed as beam breaks in 48h.

### **Experimental design:**

*Acute administration of Jak 2 inhibitor:*

The Jak 2 inhibitor was ICV or IP administrated during the light phase (4 hours before dark phase).

#### ICV administration (1µL/mouse)

The Jak 2 inhibitor was dissolved in 100% DMSO. Several concentrations (50 ; 25 ; 12.5 ; 6.12; 3 ; 1.5 and 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) were used and compared to vehicle (100% DMSO). Food intake was recorded 1h, 2h, 4h and 24h after injection. Body weight was measured 24h after injection.

#### IP administration (0.1mL/mouse)

The Jak 2 inhibitor was dissolved in 33% DMSO and sterile water. Several concentrations (0.05, 0.1 and 0.2 mg/0.1mL) were used and compared to vehicle (33% DMSO in sterile water). Food intake was recorded 1h, 2h, 4h and 24h after injection. Body weight was measured 24h after injection.

#### *Chronic administration of Jak 2 inhibitor*

ICV administration of Jak 2 inhibitor was performed weekly or continuously by using a minipump. IP administration of Jak 2 inhibitor was performed daily or twice daily.

#### Weekly ICV administration of Jak 2 inhibitor

The Jak 2 inhibitor was dissolved in 100% DMSO. Chow-fed mice were injected once a week for 3 weeks, then twice a week for 2 weeks. Jak 2 inhibitor (3.12 and 6.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{L}$ ) was administrated during light phase. Food intake and body weight were recorded daily. A NMR was performed before and after starting treatment.

#### Continuously ICV administration of Jak 2 inhibitor by minipump

The Jak 2 inhibitor was dissolved in 50% DMSO and aCSF. Two experiments were performed: mice received continuously vehicle (50% DMSO) or the Jak 2 inhibitor (3 and 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  for experiment 1 and 1.5 and 12  $\mu\text{g}/24\text{h}$  for experiment 2) for 4 weeks. Mice were fed with a normal-chow diet for 2 weeks then with a HFD for 2 weeks. Food intake and body weight were recorded daily. A NMR was performed before, at 2 weeks and at the end of the treatment.

#### Chronic IP administration of Jak 2 inhibitor

The Jak 2 inhibitor was dissolved in 33% DMSO. Mice were fed with a chow diet for 28 days then with a HFD for 10 days.

First, chow-fed mice received daily then twice-daily the Jak 2 inhibitor (0.03 and 0.05 mg/0.1mL) or vehicle (33% DMSO) for 28 days. Injections were performed during light phase (8am for the daily injections and 8am and 1pm for the twice-daily injections). Food intake and body weight were recorded daily. A NMR was performed before, at 2 weeks and at the end of the treatment.

Then, HFD mice received twice-daily the Jak 2 inhibitor (0.03 mg/0.1mL) or vehicle for 10 days. Injections were performed during light phase (8am and 1pm). Food intake and body weight were recorded daily. A NMR was performed before, at 2 weeks and at the end of the treatment.

#### *Coadministration of Jak 2 inhibitor and Leptin*

ICV administration of Jak 2 inhibitor (1.5  $\mu\text{g}$ ) was performed simultaneously with IP administration of leptin (2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) during light phase (4hours before dark phase).

#### *Coadministration of Jak 2 inhibitor and H2O2*

ICV administration of Jak 2 inhibitor (1.5 $\mu\text{g}$ ) was performed 30-45 min before ICV administration of H2O2 (5 $\mu\text{M}$ ) during light phase (just before dark phase) and after 24h fasting.

## Statistics

Statistical analysis was performed using Statistica version 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK). All values are reported as means  $\pm$  standard errors (SEM). Data from feed efficiency and 24h body weight changes were analyzed using one or two-way ANOVA, using genotype and treatment as variables. Body weight gain and changes in food intake across time were analyzed by repeated-measures ANOVA. Significant ANOVA were followed by Fisher least significant differences post hoc test.  $P < 0,05$  denoted statistical significance.

## Results

### Acute studies

#### **I. Acute ICV studies**

##### **1. Acute effects of the ICV Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 on food intake in C57Bl6J mice**

We tested 7 doses of NVS\_BSK805 ICV: 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in 1  $\mu\text{L}$  volume and observed that the 50 and 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  doses led almost immediately to malaise in our animals, during the study or soon afterwards. There is no difference of food intake and body weight between the 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  group and the vehicle group. Conversely, mice in the 12.5 ( $p < 0.001$ ), 6.25 ( $p = 0.01$ ) and 3.12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p = 0.02$ ) group ate significantly more and had an increase in body weight when compared to the vehicle (DMSO) group (**Figure 1**).

##### **2. Acute effects of the ICV Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 (dose 3.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) on the peripheral glucose and insulin tolerance in C57Bl6J mice**

- GTT: acute ICV administration of Jak 2 inhibitor (1  $\mu\text{L}$ /mouse; dose 3,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; associated with an orexigenic effect) or DMSO (1  $\mu\text{L}$  /mouse) was performed 1h before the IP injection of glucose in 15 C57Bl6J mice. There was no significant difference between the mice.
- ITT: Similarly, 3 days later, acute ICV administration of Jak 2 inhibitor (1  $\mu\text{L}$  /mouse; dose 3,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; associated with an orexigenic effect) or DMSO (1  $\mu\text{L}$  /mouse) was performed 1h before the IP injection of insuline in the same C57Bl6J mice. There was no significant difference between mice.

##### **3. Acute effects of the ICV Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 (dose 3.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) on the energy expenditure in C57Bl6J mice**

After 3 days of habituation in metabolic cages, an acute ICV administration of Jak 2 inhibitor (1  $\mu\text{L}$  /mouse; dose 3,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; associated with an orexigenic effect) or DMSO (1  $\mu\text{L}$  /mouse) was performed in 12 C57Bl6J mice. After the ICV injection, mice were placed back in their metabolic cages: energy expenditure, respiratory quotient, food and water consumption and heat production measurements were performed for 24 hours. Body weight was also measured before and 24h after the ICV administration as described previously.

We observed a decrease in body weight in the vehicle group which was not observed in the Jak 2 inhibitor group. Food intake, water intake,  $\text{VO}_2$  and  $\text{VCO}_2$  consumption and energy expenditure were increased in mice treated with Jak 2 inhibitor compared to mice treated with vehicle ( $p = 0.17$ ,  $p = 0.03$ ,  $p = 0.04$ ,  $p = 0.05$ ,  $p = 0.05$  respectively). There were no differences in locomotor activity and Respiratory exchange ratio (RER) between

the mice (**Figure 2**). In conclusion, energy expenditure is increased in mice treated with Jak 2 inhibitor compared to the vehicle group.

## **II. Acute IP studies**

### **1. Acute effects of the systemic Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 on food intake in C57Bl6J mice**

We tested 3 doses of NVS\_BSK805 IP: 0.2, 0.1, and 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 0.1  $\mu\text{l}$  volume by mice. We observed that the 0.2, and 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  doses do not act on food intake or 24h body weight. The dose 0.05  $\mu\text{g}$  led to a significant increase in food intake 1h ( $p=0.006$ ), 2h ( $p=0.016$ ) and 4h ( $p=0.035$ ) after the IP injection, compared to its vehicle (DMSO). It does not act on the FI and BW 24h after the treatment. (**Figure 3**).

### **2. Acute effects of the IP Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 (dose 0.05 mg/0.1mL/injection/mouse) on the energy expenditure in C57Bl6J mice**

Similarly as described previously, after 3 days placed in metabolic cages, acute IP administrations of Jak 2 inhibitor (0.1 ml /mouse; dose 0.03mg/0.1mL; associated with an orexigenic effect) or DMSO (0.1 ml /mouse) were performed in 12 C57Bl6J mice.

There were no differences in body weight, food intake, water intake, energy expenditure, heat production,  $\text{VO}_2$  and  $\text{VCO}_2$  consumption and RER between the 2 groups (**Figure 4**).

## **Conclusion:**

Here we showed that an acute central (ICV) and peripheral (IP) administration of NVS\_BSK805 increases food intake in chow-fed C57Bl6J mice.

The acute ICV administration of NVS\_BSK805 increases significantly the body weight, food intake and energy expenditure in chow-fed C57Bl6J mice.

## **Chronic studies**

### **I. Chronic ICV studies**

To further study the chronic impact of the treatment on food intake and body weight, ICV administrations were done once or twice a week for 5 weeks in C57Bl6J mice.

We first chose to start with the doses acting on FI after an acute administration.

#### **1. ICV administration once a week for 3 weeks**

The ICV dose 3.12  $\mu\text{g}$  of Jak 2 inhibitor, once a week, induced a non significant increase in food intake and body weight 3 weeks after the beginning of the treatment ( $p=0.2$  at day 14 and  $p=0.6$  at day 21) (**Figure 5A, 5B**). The cumulative food intake was not different compared to the vehicle group ( $p=0.7$ ) (**Figure 5C**).

After 3 weeks of ICV administration once a week of the treatment, the MRI showed a significant increase in fat mass in mice treated with the compounds (dose 3.12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ICV 1x/wk) compared to mice treated with vehicle (DMSO) (+ 0.77 g vs + 0.40 g;  $p=0.008$ ) (**Figure 5D**). This effect was associated with a non significant increase in body weight (BW) ( $p=0.188$ ) (**Figure 5E**).

The ICV dose of 6.25  $\mu\text{g}$  had no effect on food intake, body weight and fat mass (**Figure 5**).

## **2. ICV administration twice a week for 2 weeks**

Then, due to the lack of orexigenic effect in these chronic conditions, we decided to increase the frequency of the ICV administrations from 1 to 2x/ week, using the same doses for 2 weeks. We were not able to find any effect on food intake, body weight and fat mass. (*Data not shown*)

## **3. ICV continuous administration using an osmotic minipump**

Finally, we used osmotic minipumps to inject continuously by ICV administration the compound using 4 different doses (1.5, 3.12, 6.25 and 12.5 ug/24h) for 2 weeks in chow-fed conditions and then for 2 weeks in HFD conditions. A NMR was performed before the beginning of the treatment (IRM0), then after 2 weeks in chow-fed conditions (IRM1) and after 2 weeks of HFD (IRM2). **Figure 6**

### **a. In chow-fed conditions for 2 weeks**

In chow-fed C57Bl6J mice, there were no differences in food intake, body weight and fat mass between the group treated with Jak 2 inhibitor or its vehicle (DMSO).

### **b. In HFD conditions for 2 weeks**

Under HFD conditions, as usually expected, all the mice increased body weight and decreased food intake (after an initial short-lasting increase; 2,5 g/24h instead of 5 g/24h under chow food).

There were absolutely no difference in food intake, body weight and fat mass between the mice treated with the Jak 2 inhibitor and the mice treated with the vehicle (DMSO).

## **II. Chronic IP studies**

### **Chronic effects of IP Jak 2 inhibitor NVS\_BSK805 on food intake in C57Bl6J mice**

To further study the chronic impact of the treatment on food intake and body weight, IP administrations were done once or twice a week for 4 weeks in C57Bl6J mice.

### **1. IP once a week**

First, we administrated the compound once a week using the same dose acting on FI in acute conditions (0,05 mg/0.1 mL/mouse) and in addition we added a lower dose (not a higher to avoid any toxicity) of 0.03 mg/0.1 ml/mouse for 14 days.

In case of daily injections for 2 weeks, the treatment did not shown to act on daily and cumulative food intake, body weight and fat mass (**Figure 7C, 7D, 7F**).

### **2. IP twice a week**

#### **a. In chow-fed conditions**

##### **i. Food intake**

Then, we choose to increase the administration's frequency to twice a day, in the same C57Bl6J chow-fed mice for 2 weeks.

There was no difference in food intake, but a non significant increase in body weight was observed in mice treated with the Jak 2 inhibitor whereas a significant increase in fat mass was observed in mice treated with the

0.05 mg dose 2x/day (+0.21 g vs -0.21 g in the DMSO group;  $p=0.037$ ) and in mice treated with the 0.03 mg dose 2x/day (+0.10 g vs -0.21 g in the DMSO group;  $p=0.05$ ) (**Figure 7F, 7G, 7H**).

#### **b. In HFD conditions**

After 2 weeks of treatment in chow-fed conditions, the same mice were fed with a HFD diet for 10 supplementary days and were injected twice a day with the Jak 2 inhibitor using the 0.03 mg/injection dose or DMSO as a vehicle.

This time, mice treated with the compound presented a non significant decrease in body weight (-0.42g and -0.18 g in the DMSO group;  $p=0.282$ ).

The lost of body weight in Jak 2 inhibitor-treated mice was increased in mice previously treated with the compound during the chow experiment.

There were no significant differences in food intake, body weight and fat mass changes among the groups.

#### **Conclusion:**

Our results showed that a chronic weekly ICV or a daily IP administration of the Jak 2 inhibitor leads to a significant increase in fat mass in chow-fed C57Bl6J mice. This effect is associated with a non significant increase in body weight.

No metabolic effect of the compound was observed in case of continuous ICV administration.

#### **Effects of the Jak 2 inhibitor on the anorexigenic effect induced by leptin and by a hypothalamic increase in ROS levels (H2O2).**

##### **I. Acute effects of the ICV Jak 2 inhibitor on the anorexigenic effect induced by leptin in C57Bl6J mice**

To further confirm the role of Jak 2 in the anorexigenic effect of leptin, we first performed pharmacological studies in which an ICV administration of leptin at a dose decreasing food intake (2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{L}/\text{mouse}$ ) was combined with an ICV administration of Jak 2 inhibitor at a dose not acting on food intake (dose 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; ICV 1  $\mu\text{Lx}/\text{mouse}$ ) in C57Bl6J mice.

We found that Jak 2 inhibitor blunts the appetite-suppressant effect of Leptin (**Figure 8**).

##### **II. Acute effects of the ICV Jak 2 inhibitor on the anorexigenic effect induced by ICV H2O2 in C57Bl6J mice**

###### *Effect of H2O2 on food intake in C57Bl6J mice*

An ICV administration of H2O2, a ROS (reactive oxygen species), induced a decrease in food intake and body weight similarly to leptin.

We performed ICV administration of H2O2 combined with an ICV administration of Jak 2 inhibitor at a dose not acting on food intake (dose 1.06  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; ICV 1  $\mu\text{Lx}/\text{mouse}$ ) in C57Bl6J mice.

We showed that Jak 2 inhibitor blunts the appetite-suppressant effect of H2O2 (**Figure 9**).

#### **Conclusion**

Jak 2 inhibitor NVP\_BSK805 blunts the appetite-suppressant effect of leptin and H2O2.

## Discussion

The goal of this study was to investigate the effects of a Jak 2 inhibitor NVP\_BSK805 on energy balance. An acute administration of Jak 2 inhibitor increased food intake and body weight in chow-fed mice.

After an ICV administration of NVP\_BSK805, we observed a significant increase in food intake and body weight 24h after the injection. This effect was associated with an increase in 24h-energy expenditure, measured by indirect calorimetry.

After an IP administration of Jak 2 inhibitor we observed an increase in food intake 1h, 2h and 4h after the injection. Unlike the ICV studies, no difference of food intake, body weight and energy expenditure were observed 24h after the injection. This absence of effect can be explained by differences in the way of administration (different pharmacokinetic properties) and by the blood brain barrier impermeability of the compound.

We also observed that chronic ICV or IP administration of Jak 2 inhibitor induced an increase in fat mass in chow-fed mice.

After 3 weeks of ICV administration once a week of NVP\_BSK805, the NMR showed a significant increase in fat mass in mice treated with the compound. Similar results were observed during chronic IP administration.

This effect on fat mass was associated with a non significant increase in body weight. However, Verstovsek (5) had described a significant weight gain in patients with myelofibrosis treated by Ruxolitinib, a Jak 1 and Jak 2 inhibitor, compared to patients treated by placebo. Patients with myelofibrosis have chronic and severe diseases often associated to body weight loss. Ruxolitinib may promotes weight regain in this pathological condition. It could be interesting to evaluate the effect of NVP\_BSK805 on body weight in pathological conditions : food restriction, chronic inflammation or cancer.

No difference was observed during continuously administration of the Jak 2 inhibitor by osmotic minipump. This can be explained by the use of an inadequate dose or by the poor solubility of the compound in aCSF.

This results confirmed that NVP\_BSK805 can influence body composition and energy balance. For further investigation, we plan to evaluate the effects of a chronic administration of NVP\_BSK805 on body weight, food intake and energy expenditure using metabolic cages.

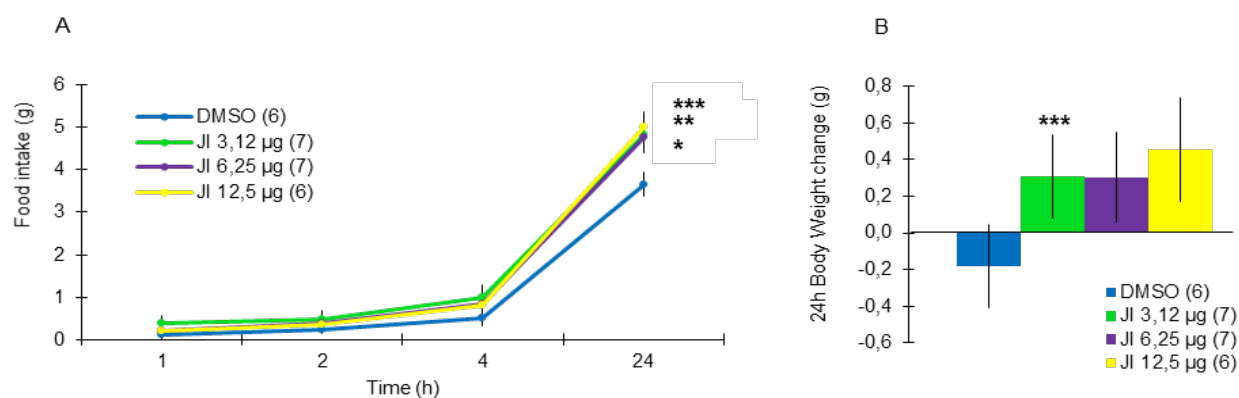
To finish, Jak 2 inhibitor seems to blunt the appetite-suppressant effect of leptin and H2O2. To confirm the implication of the Jak/STAT pathway in the hypothalamic signaling of leptin, we plan to compare the phosphorylation's levels of STAT3 and STAT5 in the hypothalamus of chow fed mice after a coadministration of leptin and Jak 2 inhibitor or its vehicle.

## Conclusion

In conclusion, the present study indicates that the Jak 2 inhibitor NVP\_BSK805 is able to modulate the regulation of energy balance. It seems that this compound induces an increase in food intake and energy expenditure probably by acting on the signaling pathway of anorexigenic molecules such as leptin.

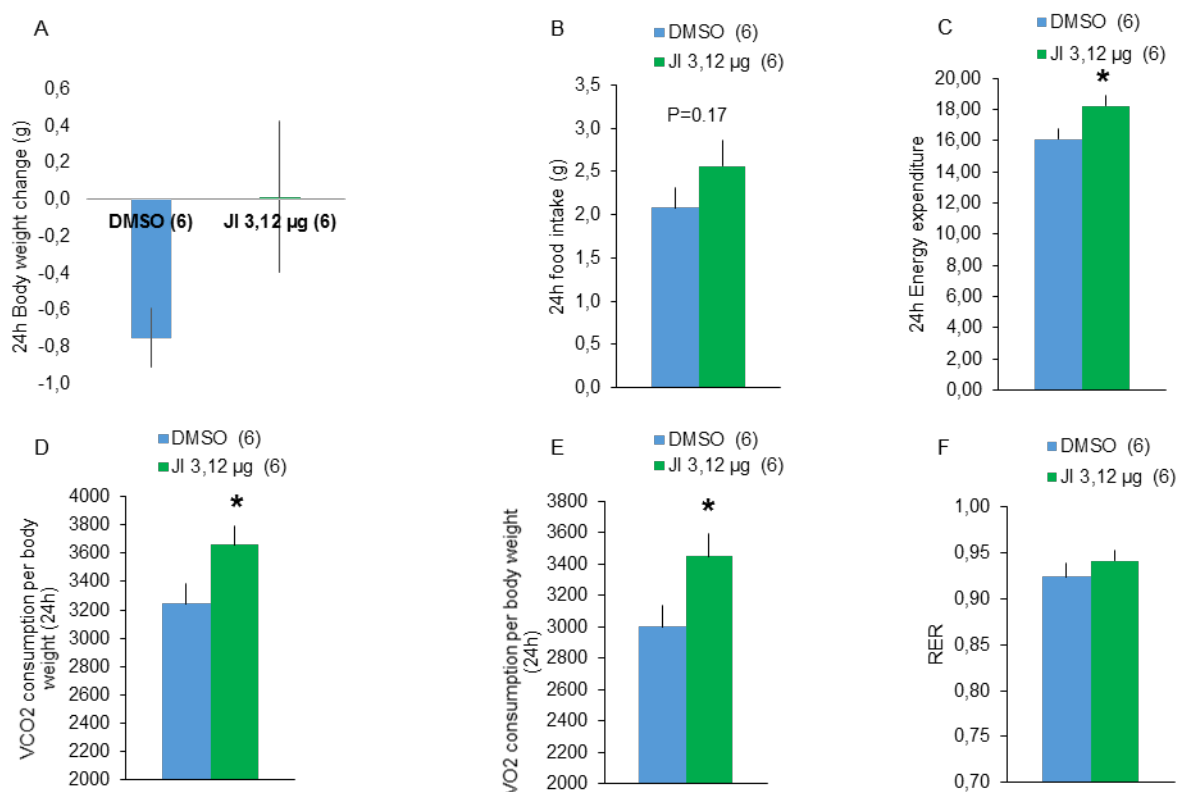
Undoubtedly, targeted therapies have nowadays a very important role in the treatment of cancers. However, because of their interference with specific molecules involved in intracellular pathways regulating cell growth, they cause a lots of different and new side effects. A more comprehensive analysis of the underlying mechanisms of these effects could help to optimize the management of these patients under treatment.

## Figures



**Figure 1 : Effects of ICV administration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) on food intake (A) and body weight changes (B) in C57Bl6J chow-fed mice.**

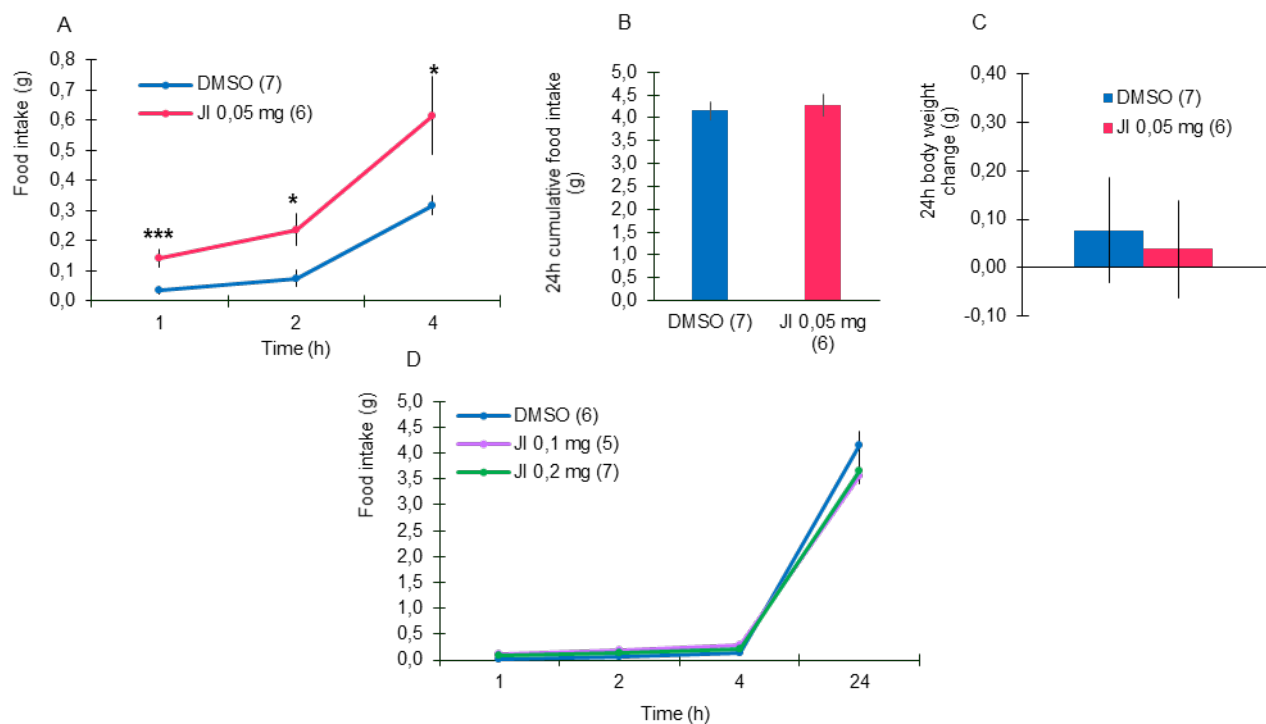
In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Figure 2 : Body weight change (A), Food intake (B), Energy expenditure (C), VCO<sub>2</sub> consumption (D), VO<sub>2</sub> consumption (E) and RER (F) 24h after ICV administration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (3,12µg/µL) or DMSO in chow fed mice.**

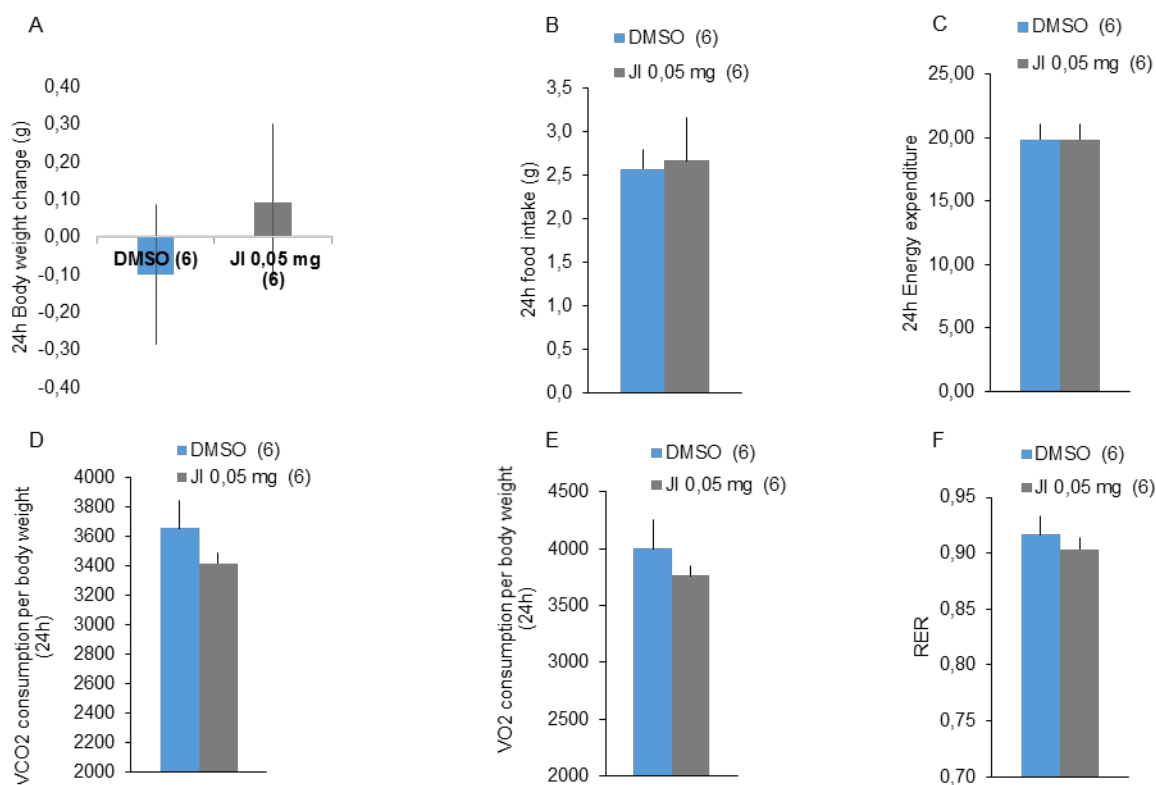
In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .





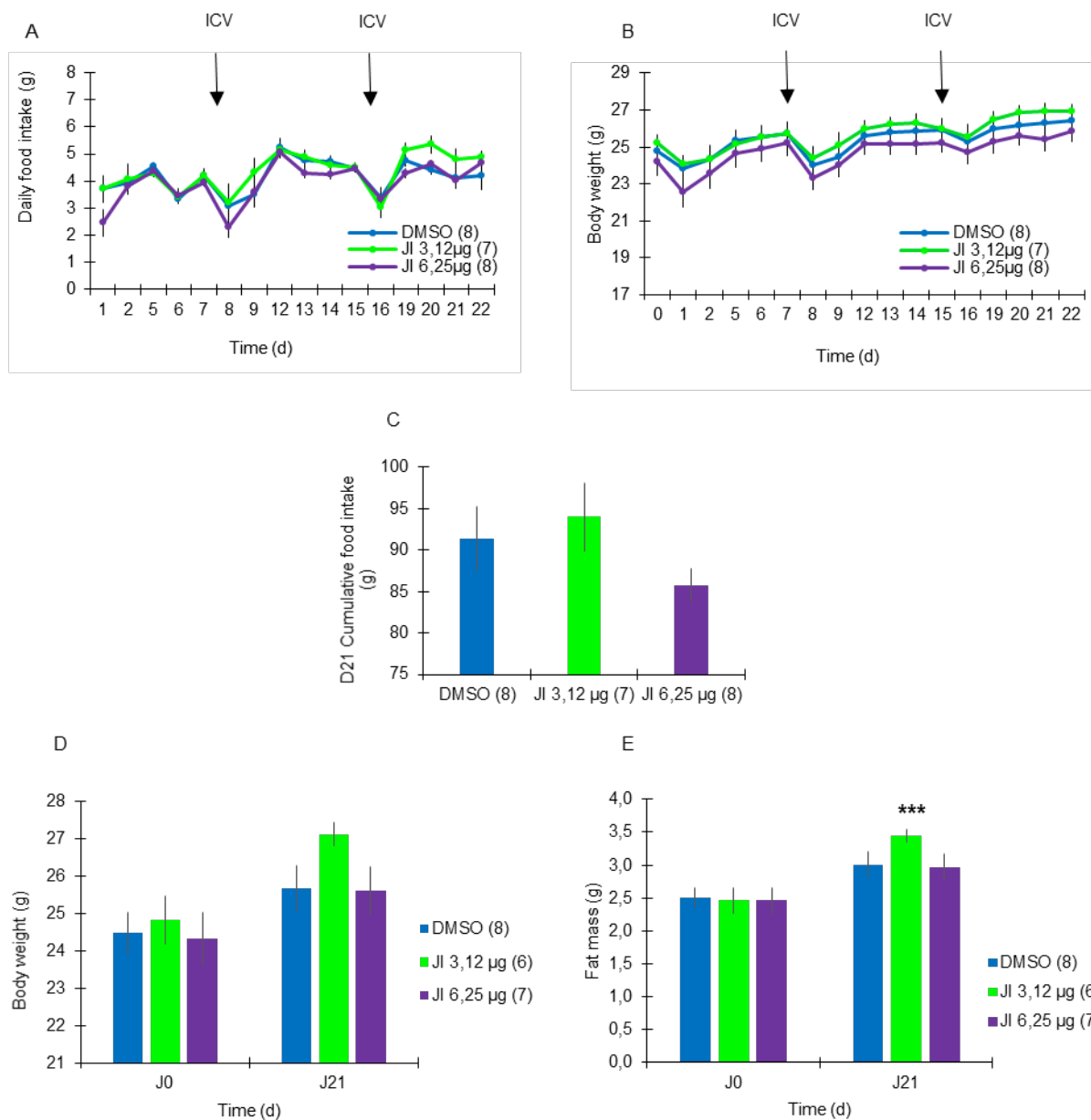
**Figure 3 : Effects of IP administration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) on food intake and body weight changes in C57Bl6J chow-fed mice.**

Food intake 1h, 2h, 4h (A) and 24h (D) after injection. 24h cumulative food intake (B), 24h Body weight change (C)  
In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

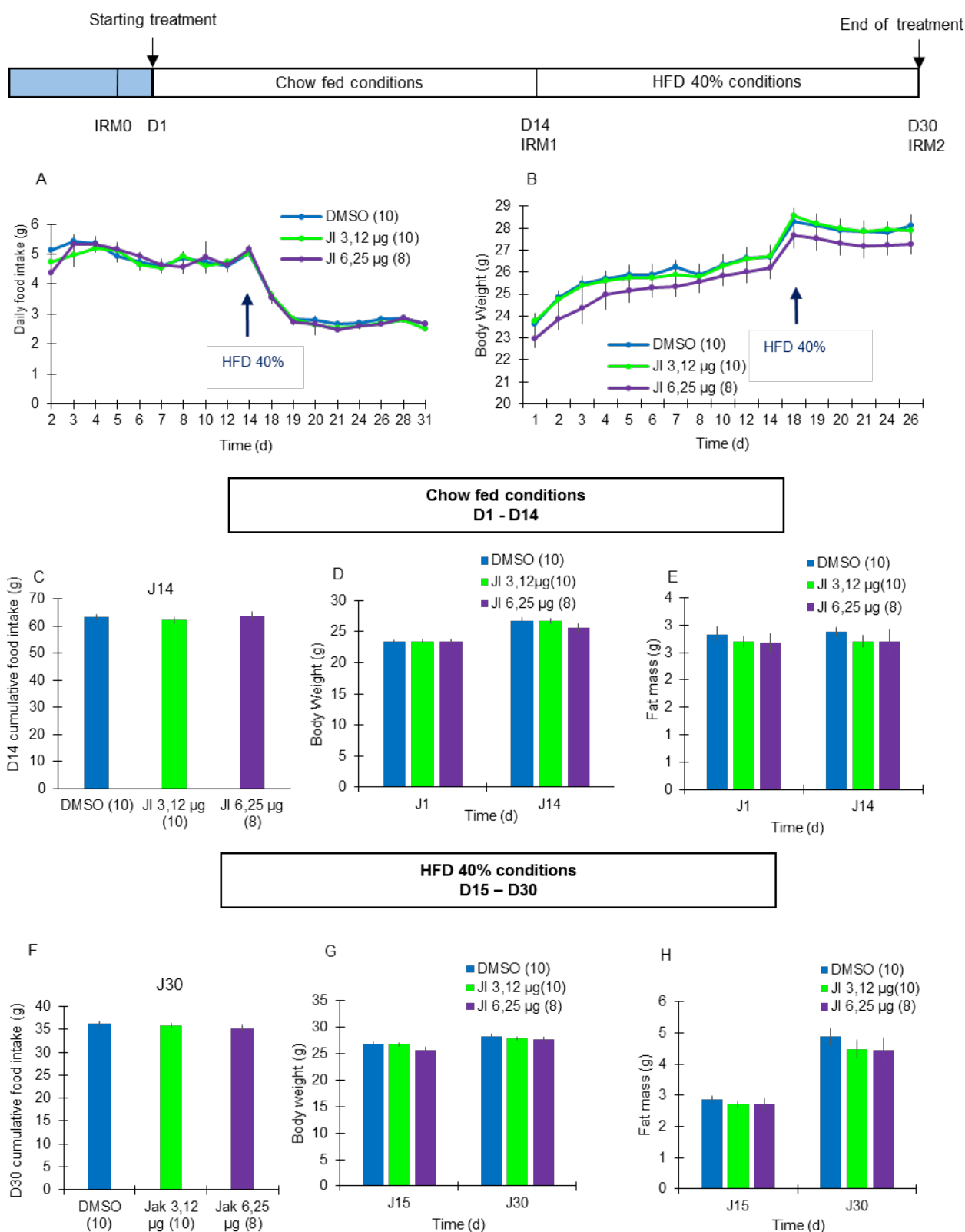


**Figure 4 : Body weight change (A), Food intake (B), Energy expenditure (C), VCO2 consumption (D), VO2 consumption (E) and RER (F) 24h after IP administration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (0,03Mg/0,1mL) or DMSO in chow fed mice.**

In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM..



**Figure 5 : Effects of ICV administration once a week of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) on food intake (A, C), body weight changes (B, D) and fat mass (E) in C57Bl6J chow-fed mice.**  
In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*:  $p < 0,001$ .



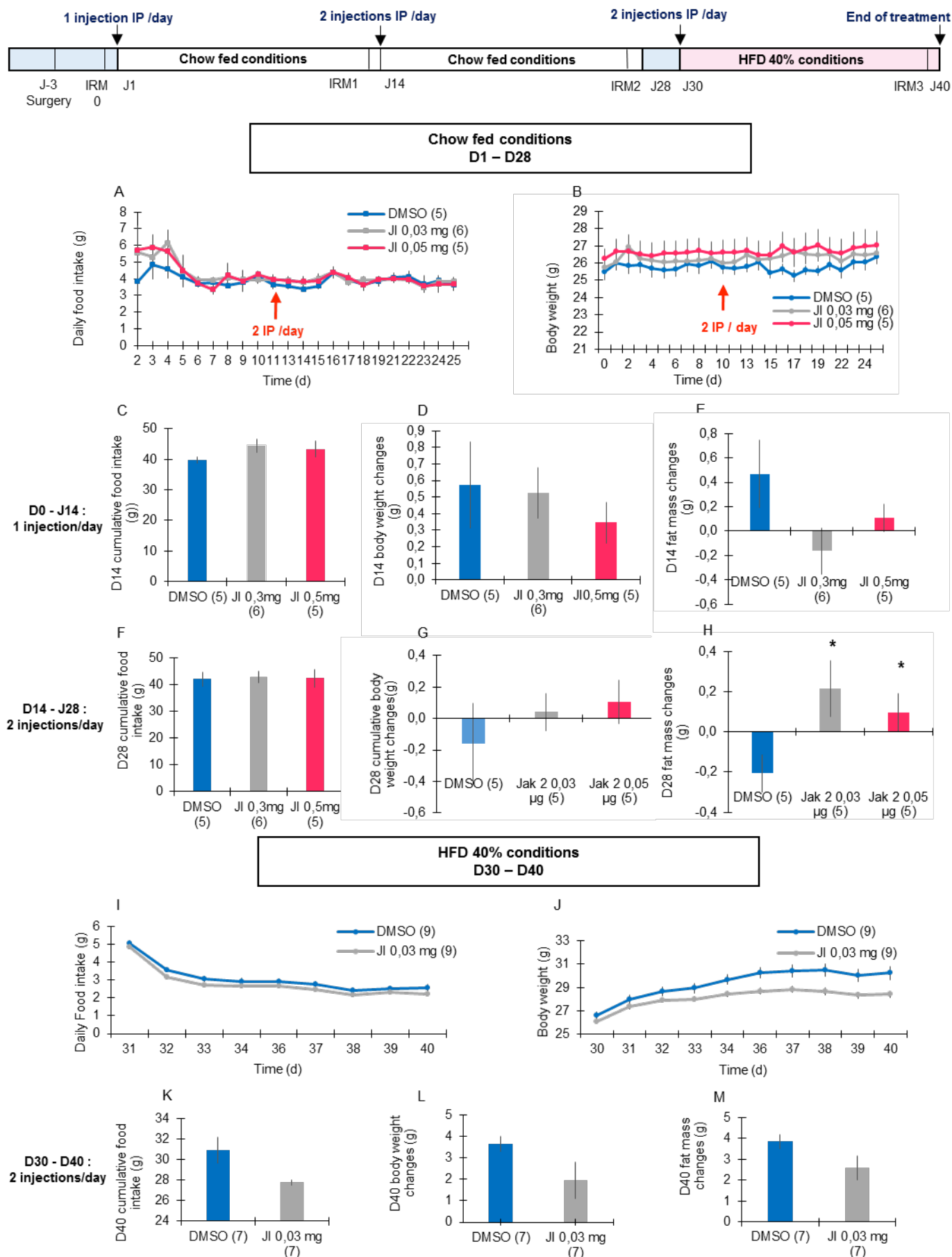
**Figure 6 : Effects of ICV administration continuously by minipump of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) on food intake, body weight changes and fat mass in C57Bl6J chow-fed mice and HFD mice.**

(A,B) Daily food intake and body weight D1-D30

(C, D, E) Cumulative food intake, body weight and fat mass in chow fed conditions

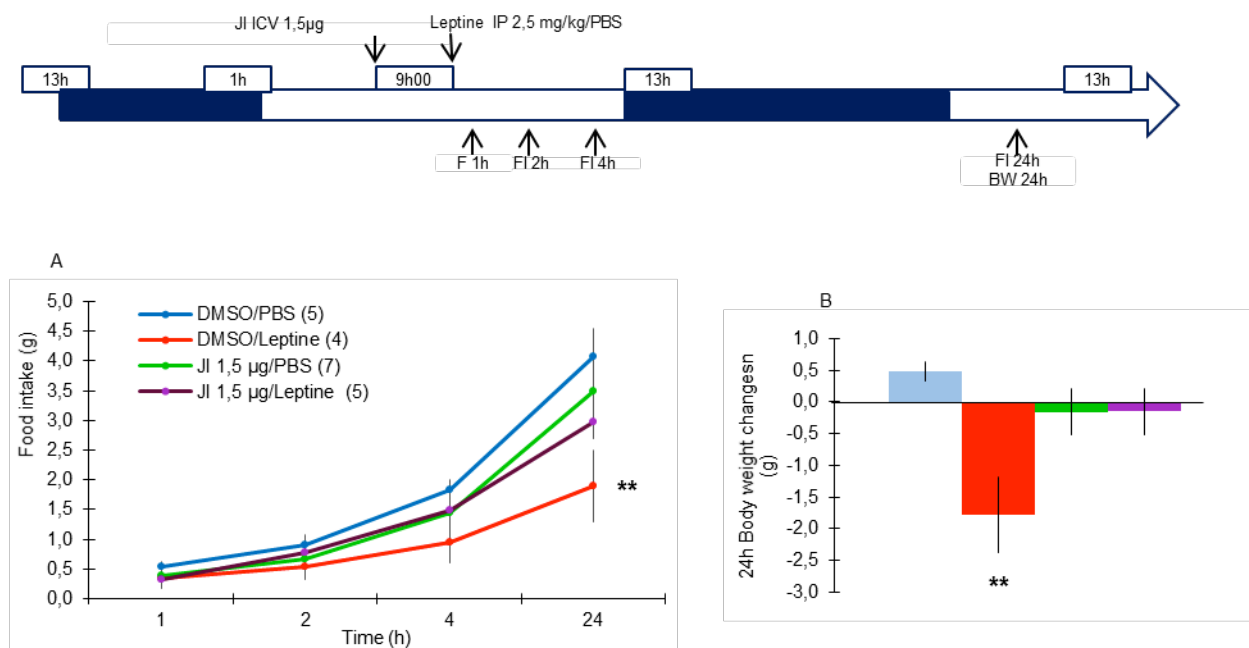
(F, G, H) Cumulative food intake, body weight and fat mass in HFD conditions

In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM.



**Figure 7 : Effects of chronic IP administration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) on food intake, body weight changes and fat mass in C57Bl6J chow-fed mice and HFD mice.**

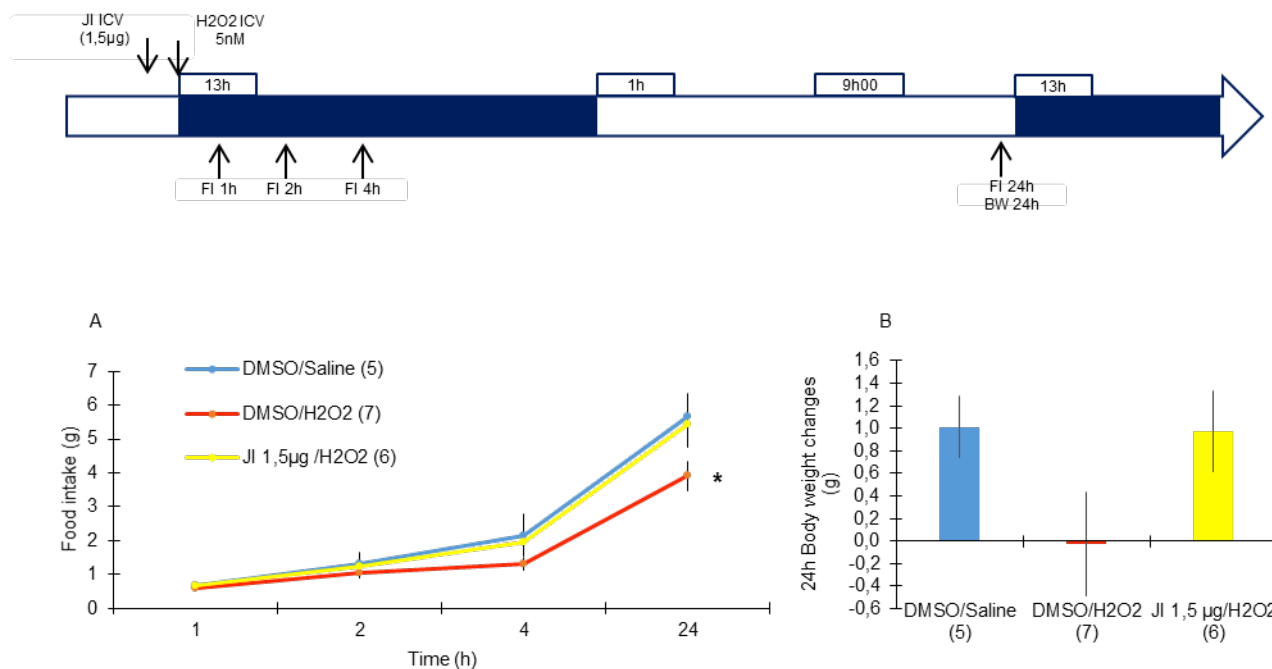
(A,B) Daily food intake and body weight D1-D30 in chow fed conditions. (C, D, E) Cumulative food intake, body weight and fat mass in chow fed conditions and 1IP/day. (F, G, H) Cumulative food intake, body weight and fat mass in chow fed conditions and 2IP/day. (I, J) Daily food intake and body weight D30-D40 in HFD conditions. (K, L, M) Cumulative food intake, body weight and fat mass in HFD conditions. In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .



**Figure 8 : Effects of coadministration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) and Leptin on food intake (A) and body weight changes (B) in C57Bl6J chow-fed mice.**

In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$

## Bibliography



**Figure 9 : Effects of coadministration of the Jak2 inhibitor NVS-BSK805 (JI) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on food intake (A) and body weight changes (B) in C57Bl6J chow-fed mice.**

In parenthesis: number of animals. Data are Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

1. Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*. mai 2007;132(6):2158–68.
2. Morton GJ, Blevins JE, Kim F, Matsen M, Figlewicz DP. The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. juill 2009;297(1):E202–10.
3. Kontzias A, Kotlyar A, Laurence A, Changelian P, O'Shea JJ. Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Curr Opin Pharmacol*. août 2012;12(4):464–70.
4. Fleischmann R, Kremer J, Cush J, Schulze-Koops H, Connell CA, Bradley JD, et al. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 9 août 2012;367(6):495–507.
5. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 1 mars 2012;366(9):799–807.
6. Bellocchio L, Soria-Gómez E, Quarta C, Metna-Laurent M, Cardinal P, Binder E, et al. Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB<sub>1</sub> receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 mars 2013;110(12):4786–91.
7. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol*. 10 nov 2007;505(2):209–20.
8. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. oct 2010;3(9-10):525–34.
9. Cardinal P, André C, Quarta C, Bellocchio L, Clark S, Elie M, et al. CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Mol Metab*. oct 2014;3(7):705–16.

## **PUBLICATION 1**

**Normotensive incidentally discovered pheochromocytomas display specific biochemical, cellular and molecular characteristics**

**Publié dans le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**

**Novembre 2013**

**Ce travail est le résultat d'une collaboration avec l'équipe du laboratoire INSERM U982 Equipe « Communication neuronale et neuroendocrine » de Rouen et de plusieurs centres hospitaliers spécialisés dans les tumeurs surrénaliennes.**

## **PUBLICATION 2**

**Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis**

**Publié dans Molecular and Cellular Endocrinology**

**Aout 2014**

**Ce travail est une revue sur le rôle de la voie mTOR dans la régulation de la balance énergétique et a été réalisé avec Nicolas Saucisse, doctorant, et le Dr Daniela Cota.**



## **PUBLICATION 3**

**Actualités du syndrome de Cushing d'origine surrénalienne**

**Publié dans les Annales d'Endocrinologie**

**Novembre 2014**

**Ce travail a été réalisé avec le Pr Antoine Tabarin dans le cadre d'une session de communications orales particulièrement valorisée au congrès national de la Société Française d'Endocrinologie (SFE) et de la publication d'un numéro spécial annuel des Annales d'Endocrinologie. Il a été réalisé grâce au laboratoire IPSEN qui m'a permis d'aller au congrès international de l'Endocrine 2014 à Chicago et de rapporter sous forme de synthèse les nouveautés de l'année concernant la génétique des tumeurs surrénaliennes au congrès de la SFE 2014.**

#### **PUBLICATION 4**

**Per-operative Hemodynamic Instability in normotensive patients with incidentally discovered pheochromocytomas**

**Publié dans le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**

**Février 2015**

**Ce travail a été réalisé par le Dr Mathilde Lafont sous la direction du Pr Tabarin à l'Hopital Haut Lévêque. J'ai participé à cette étude en réalisant les analyses statistiques.**

## **PUBLICATION 5**

**Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors and mTORC1 signalling pathway interact to modulate glucose homeostasis**

**Accepté au journal Disease Models & Mechanisms**

**Novembre 2015**

**Ce travail a été réalisé par le Dr Bermudez Silva, chercheur à Malaga, au cours d'une collaboration avec l'équipe du Dr Cota. J'ai participé à ce travail en faisant des extractions de pancréas chez des souris, en mettant en cultures des îlots pancréatiques selon différentes conditions de glycémie et de traitement par un antagoniste de CB<sub>1</sub>, le rimonabant ou par de la rapamycine et en dosant l'insuline sécrétée par ELISA.**

## **PUBLICATION 6**

### **Etiopathogeny of primary adrenal hypercortisolism**

**Soumis à Frontiers in Endocrinology**

**Octobre 2015**

**Ce travail a été réalisé par le Dr Fritz-Line Cephise Velayoudom sous la direction du Pr Tabarin. J'y ai participé en faisant une synthèse des nouveautés en matière de génétique des tumeurs surrénaliennes, en particulier dans les hyperplasies macronodulaires des surrénales et les adénomes surrénaliens.**

# . BIBLIOGRAPHIE

- Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246–260.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551.
- Allen, R.G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 463–499.
- Alquier, T., Leloup, C., Atef, N., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2003). Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J. Neuroendocrinol.* 15, 75–79.
- Ambrogini, E., Almeida, M., Martin-Millan, M., Paik, J.-H., Depinho, R.A., Han, L., Goellner, J., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., O'Brien, C.A., et al. (2010). FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab.* 11, 136–146.
- Andrews, Z.B., Horvath, B., Barnstable, C.J., Elsworth, J., Elseworth, J., Yang, L., Beal, M.F., Roth, R.H., Matthews, R.T., and Horvath, T.L. (2005a). Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 184–191.
- Andrews, Z.B., Diano, S., and Horvath, T.L. (2005b). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 829–840.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4753–4758.
- Arsham, A.M., Howell, J.J., and Simon, M.C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J. Biol. Chem.* 278, 29655–29660.
- Averous, J., and Proud, C.G. (2006). When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 25, 6423–6435.
- Avruch, J., Belham, C., Weng, Q., Hara, K., and Yonezawa, K. (2001). The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 26, 115–154.
- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., and Porte, D. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 46, 1549–1557.
- Barbieri, E., and Sestili, P. (2012). Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J. Signal Transduct.* 2012, 982794.
- Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat. Rev. Genet.* 3, 589–600.
- Belgardt, B.F., and Brüning, J.C. (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 97–113.
- Belgardt, B.F., Okamura, T., and Brüning, J.C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *J. Physiol.* 587, 5305–5314.
- Bell, E.L., Klimova, T.A., Eisenbart, J., Moraes, C.T., Murphy, M.P., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177, 1029–1036.
- Bellochio, L., Soria-Gómez, E., Quarta, C., Metna-Laurent, M., Cardinal, P., Binder, E., Cannich, A., Delamarre, A., Häring, M., Martín-Fonchea, M., et al. (2013). Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB<sub>1</sub> receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4786–4791.
- Benani, A., Troy, S., Carmona, M.C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152–160.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9048–9052.

- Berthoud, H.-R., Sutton, G.M., Townsend, R.L., Patterson, L.M., and Zheng, H. (2006). Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol. Behav.* *89*, 517–524.
- Bhaskar, P.T., and Hay, N. (2007). The two TORCs and Akt. *Dev. Cell* *12*, 487–502.
- Biggers, D.W., Myers, S.R., Neal, D., Stinson, R., Cooper, N.B., Jaspan, J.B., Williams, P.E., Cherrington, A.D., and Frizzell, R.T. (1989). Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Diabetes* *38*, 7–16.
- Binder, E., Bermúdez-Silva, F.J., André, C., Elie, M., Romero-Zerbo, S.Y., Leste-Lasserre, T., Belluomo, I., Duchampt, A., Clark, S., Aubert, A., et al. (2013). Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. *PloS One* *8*, e74705.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* *1*, 619–625.
- Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* *209*, 1–12.
- Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab.* *8*, 459–467.
- Blouet, C., Jo, Y.-H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 8302–8311.
- Brand, M.D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* *35*, 811–820.
- Breen, T.L., Conwell, I.M., and Wardlaw, S.L. (2005). Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. *Brain Res.* *1032*, 141–148.
- Breslow, M.J., Min-Lee, K., Brown, D.R., Chacko, V.P., Palmer, D., and Berkowitz, D.E. (1999). Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am. J. Physiol.* *276*, E443–E449.
- Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol. Behav.* *89*, 687–691.
- Brown, N.F., Stefanovic-Racic, M., Sipula, I.J., and Perdomo, G. (2007). The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* *56*, 1500–1507.
- Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., and Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* *289*, 2122–2125.
- Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* *296*, 517–530.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., and Swanson, L.W. (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *348*, 41–79.
- Catania, C., Binder, E., and Cota, D. (2011). mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *Int. J. Obes.* *2005* *35*, 751–761.
- Chapman, I.M. (2008). Obesity in old age. *Front. Horm. Res.* *36*, 97–106.
- Cheadle, J.P., Reeve, M.P., Sampson, J.R., and Kwiatkowski, D.J. (2000). Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum. Genet.* *107*, 97–114.
- Chen, C., Liu, Y., Liu, Y., and Zheng, P. (2009). The axis of mTOR-mitochondria-ROS and stemness of the hematopoietic stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1158–1160.
- Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Yin, J., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., and Huang, S. (2010). Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *90*, 762–773.
- Cheng, J.B., and Russell, D.W. (2004). Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J. Biol. Chem.* *279*, 37789–37797.
- Chiarugi, P., and Cirri, P. (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 509–514.
- Cho, S.-H., Lee, C.-H., Ahn, Y., Kim, H., Kim, H., Ahn, C.-Y., Yang, K.-S., and Lee, S.-R. (2004). Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated cell signaling. *FEBS Lett.* *560*, 7–13.

- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239–242.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prévot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509–5519.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G.D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., et al. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest.* 117, 2325–2336.
- Clément, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Pénicaud, L., and Ktorza, A. (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 445, 375–380.
- Colombani, A.-L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Offer, G., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., et al. (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58, 2189–2197.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8, 571–578.
- Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., and Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25 Suppl 5, S63–S67.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927–930.
- Cota, D., Matter, E.K., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2008). The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7202–7208.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., et al. (2003a). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661.
- Cowley, M.A., Cone, R.D., Enriori, P., Louiselle, I., Williams, S.M., and Evans, A.E. (2003b). Electrophysiological actions of peripheral hormones on melanocortin neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 175–186.
- Crane, C., Panner, A., Pieper, R.O., Arbiser, J., and Parsa, A.T. (2009). Honokiol-mediated inhibition of PI3K/mTOR pathway: a potential strategy to overcome immunoresistance in glioma, breast, and prostate carcinoma without impacting T cell function. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 32, 585–592.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740.
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab.* 16, 104–112.
- De Jonghe, B.C., Hayes, M.R., and Bence, K.K. (2011). Melanocortin control of energy balance: evidence from rodent models. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2569–2588.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102–1105.
- Denu, J.M., and Tanner, K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 5633–5642.
- Diano, S., Matthews, R.T., Patrylo, P., Yang, L., Beal, M.F., Barnstable, C.J., and Horvath, T.L. (2003). Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology* 144, 5014–5021.
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., et al. (2011). Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* 17, 1121–1127.
- Dikalov, S., Losik, T., and Arbiser, J.L. (2008). Honokiol is a potent scavenger of superoxide and peroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* 76, 589–596.

- Dröge, W. (2002a). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.* **37**, 1333–1345.
- Dröge, W. (2002b). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95.
- Dumont, M., and Beal, M.F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1014–1026.
- Duval, C., Nègre-Salvayre, A., Dogilo, A., Salvayre, R., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2002). Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **80**, 757–764.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., et al. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96–99.
- Elmqvist, J.K. (2001). Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol. Behav.* **74**, 703–708.
- Elmqvist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**, 221–232.
- Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**, 90–94.
- Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Garcia Rudaz, C., and Cowley, M.A. (2011). Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 12189–12197.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **52**, 1–8.
- Findeisen, H.M., Pearson, K.J., Gizard, F., Zhao, Y., Qing, H., Jones, K.L., Cohn, D., Heywood, E.B., de Cabo, R., and Bruemmer, D. (2011). Oxidative stress accumulates in adipose tissue during aging and inhibits adipogenesis. *PLoS One* **6**, e18532.
- Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* **56**, 1219–1227.
- Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R.P., Beuve, A., and Routh, V.H. (2011). Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 505–517.
- Fraenkel, M., Ketzinil-Gilad, M., Ariav, Y., Pappo, O., Karaca, M., Castel, J., Berthault, M.-F., Magnan, C., Cerasi, E., Kaiser, N., et al. (2008). mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* **57**, 945–957.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493–1505.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., and Krizanov, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* **6**, 260–271.
- Grill, H.J., and Kaplan, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* **23**, 2–40.
- Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E.G., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **115**, 739–750.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* **11**, 859–871.
- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Pénicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 464–471.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226.



- Haissaguerre, M., Saucisse, N., and Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *397*, 67–77.
- Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A., and Friedman, J.M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 8878–8883.
- Hansen, T.K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J.S., and Jørgensen, J.O.L. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *56*, 203–206.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* *110*, 177–189.
- Harlan, S.M., Guo, D.-F., Morgan, D.A., Fernandes-Santos, C., and Rahmouni, K. (2013). Hypothalamic mTORC1 signaling controls sympathetic nerve activity and arterial pressure and mediates leptin effects. *Cell Metab.* *17*, 599–606.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* *18*, 1926–1945.
- Heldsinger, A., Grabauskas, G., Wu, X., Zhou, S., Lu, Y., Song, L., and Owyang, C. (2014). Ghrelin induces leptin resistance by activation of suppressor of cytokine signaling 3 expression in male rats: implications in satiety regulation. *Endocrinology* *155*, 3956–3969.
- Hentges, S.T., Otero-Corchon, V., Pennock, R.L., King, C.M., and Low, M.J. (2009). Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 13684–13690.
- Hill, J.W., Williams, K.W., Ye, C., Luo, J., Balthasar, N., Coppari, R., Cowley, M.A., Cantley, L.C., Lowell, B.B., and Elmquist, J.K. (2008). Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1796–1805.
- Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.-R., Chuang, J.-C., Xu, Y., Choi, M., et al. (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab.* *11*, 286–297.
- Hillebrand, J.J.G., de Wied, D., and Adan, R. a. H. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* *23*, 2283–2306.
- Ho, F.M., Liu, S.H., Liao, C.S., Huang, P.J., and Lin-Shiau, S.Y. (2000). High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* *101*, 2618–2624.
- Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., and DiLeone, R.J. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* *51*, 801–810.
- Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M., and Tschöp, M. (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* *142*, 4163–4169.
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *20*, 78–87.
- Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* *412*, 179–190.
- Hwa, J.J., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Ghibaudi, L., Williams, P., Van Heek, M., Davis, H., Rudinski, M., Sybertz, E., and Strader, C.D. (1997). Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am. J. Physiol.* *272*, R1204–R1209.
- Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* *144*, 1331–1340.
- Inhoff, T., Stengel, A., Peter, L., Goebel, M., Taché, Y., Bannert, N., Wiedenmann, B., Klapp, B.F., Mönnikes, H., and Kobelt, P. (2010). Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* *31*, 257–262.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648–657.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* *126*, 955–968.
- Jaillard, T., Roger, M., Galinier, A., Guillo, P., Benani, A., Leloup, C., Casteilla, L., Pénicaud, L., and Lersignol, A. (2009). Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* *58*, 1544–1549.

- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 77–94.
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L., and Vogt, S. (2010). New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 205–212.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15–25.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438–2443.
- Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.P., and Witters, L.A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* 24, 22–25.
- Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146, 1473–1481.
- Kim, B.H., and Cho, J.Y. (2008). Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression. *Acta Pharmacol. Sin.* 29, 113–122.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.
- Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B.E., Witters, L.A., Mimura, O., and Yonezawa, K. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 65–79.
- Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Xu, A.W., Barsh, G.S., Rossetti, L., and Accili, D. (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nat. Med.* 12, 534–540.
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., and Drent, M.L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 8, 21–34.
- Kolaczynski, J.W., Considine, R.V., Ohannesian, J., Marco, C., Opentanova, I., Nyce, M.R., Myint, M., and Caro, J.F. (1996). Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45, 1511–1515.
- Könner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., et al. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 5, 438–449.
- Krieger-Brauer, H.I., Medda, P.K., and Kather, H. (1997). Insulin-induced activation of NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Galphai2. *J. Biol. Chem.* 272, 10135–10143.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Krude, H., and Grüters, A. (2000). Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 11, 15–22.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 19, 155–157.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., and Kang, D. (2012). Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J. Biol. Chem.* 287, 3265–3272.
- Kushi, A., Sasai, H., Koizumi, H., Takeda, N., Yokoyama, M., and Nakamura, M. (1998). Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15659–15664.
- Kusssmaul, L., and Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7607–7612.
- Landree, L.E., Hanlon, A.L., Strong, D.W., Rumbaugh, G., Miller, I.M., Thupari, J.N., Connolly, E.C., Haganir, R.L., Richardson, C., Witters, L.A., et al. (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 3817–3827.
- Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594.
- Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2012a). mTOR Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

- Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012b). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Le Bacquer, O., Petroulakis, E., Pagliarunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., and Sonenberg, N. (2007). Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.* 117, 387–396.
- Leibowitz, S.F., and Wortley, K.E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25, 473–504.
- Leibowitz, G., Cerasi, E., and Ketzinel-Gilad, M. (2008). The role of mTOR in the adaptation and failure of beta-cells in type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 10 Suppl 4, 157–169.
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carrière, A., Périquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., et al. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084–2090.
- Leloup, C., Casteilla, L., Carrière, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., and Pénicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 519–530.
- Levin, B.E., Routh, V.H., Kang, L., Sanders, N.M., and Dunn-Meynell, A.A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53, 2521–2528.
- Levine, J.A., Eberhardt, N.L., and Jensen, M.D. (1999). Leptin responses to overfeeding: relationship with body fat and nonexercise activity thermogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2751–2754.
- Lin, H.V., Plum, L., Ono, H., Gutiérrez-Juárez, R., Shanabrough, M., Borok, E., Horvath, T.L., Rossetti, L., and Accili, D. (2010). Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* 59, 337–346.
- Liu, L., Cash, T.P., Jones, R.G., Keith, B., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* 21, 521–531.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80, 780–787.
- Lo, Y.Y., Wong, J.M., and Cruz, T.F. (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 15703–15707.
- Luvisetto, S., Pietrobon, D., and Azzzone, G.F. (1987). Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 7332–7338.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179–193.
- Marston, O.J., Hurst, P., Evans, M.L., Burdakov, D.I., and Heisler, L.K. (2011). Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus. *Endocrinology* 152, 4046–4052.
- Martin, T.L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., and Kahn, B.B. (2006). Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 281, 18933–18941.
- Martínez de Morentin, P.B., Martínez-Sánchez, N., Roa, J., Ferno, J., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., and Lopez, M. (2014). Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr. Mol. Med.* 14, 3–21.
- Martins, L., Fernández-Mallo, D., Novelle, M.G., Vázquez, M.J., Tena-Sempere, M., Nogueiras, R., López, M., and Diéguez, C. (2012). Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One* 7, e46923.
- May, J.M., and de Haën, C. (1979). Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2214–2220.
- McClellan, K.M., Parker, K.L., and Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 193–209.
- McCrimmon, R.J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R.J., and Sherwin, R.S. (2004). Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53, 1953–1958.
- McDaniel, M.L., Marshall, C.A., Pappan, K.L., and Kwon, G. (2002). Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 51, 2877–2885.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foulfelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.

- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., and Mobbs, C.V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47, 294–297.
- Mordier, S., and Iynedjian, P.B. (2007). Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 and insulin resistance induced by palmitate in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 206–211.
- Mori, H., Inoki, K., Münzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E.C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O.A., Myers, M.G., et al. (2009). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab.* 9, 362–374.
- Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and AgRP gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E1051–E1057.
- Morton, G.J., Blevins, J.E., Kim, F., Matsen, M., and Figlewicz, D.P. (2009). The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E202–E210.
- Nasrallah, C.M., and Horvath, T.L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 650–658.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.-C., Zolotukhin, S., et al. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS One* 7, e40191.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790.
- Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43, 533–549.
- Oberkofler, H., Klein, K., Felder, T.K., Krempler, F., and Patsch, W. (2006). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the transcriptional regulation of the human uncoupling protein 2 gene in INS-1E cells. *Endocrinology* 147, 966–976.
- Obici, S., Feng, Z., Tan, J., Liu, L., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1079–1085.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271–275.
- Oishi, K., Zheng, B., and Kuo, J.F. (1990). Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* 265, 70–75.
- Okamoto, H., Nakae, J., Kitamura, T., Park, B.-C., Dragatsis, I., and Accili, D. (2004). Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114, 214–223.
- Olszewski, P.K., Wirth, M.M., Grace, M.K., Levine, A.S., and Giraudo, S.Q. (2001). Evidence of interactions between melanocortin and opioid systems in regulation of feeding. *Neuroreport* 12, 1727–1730.
- Ono, H., Pocai, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, J.M., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2008). Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J. Clin. Invest.* 118, 2959–2968.
- Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K., Tanimura, K., Nakashima, A., Eguchi, S., Miyamoto, T., Hara, K., Takehana, K., Avruch, J., et al. (2007). The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J. Biol. Chem.* 282, 20329–20339.
- Palomba, L., Silvestri, C., Imperatore, R., Morello, G., Piscitelli, F., Martella, A., Cristino, L., and Di Marzo, V. (2015). Negative Regulation of Leptin-induced Reactive Oxygen Species (ROS) Formation by Cannabinoid CB1 Receptor Activation in Hypothalamic Neurons. *J. Biol. Chem.* 290, 13669–13677.
- Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232.
- Patten, D.A., Lafleur, V.N., Robitaille, G.A., Chan, D.A., Giaccia, A.J., and Richard, D.E. (2010). Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 21, 3247–3257.
- Peterson, R.T., Desai, B.N., Hardwick, J.S., and Schreiber, S.L. (1999). Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4438–4442.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–886.
- Piotrowski, W.J., and Marczak, J. (2000). Cellular sources of oxidants in the lung. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 13, 369–385.

- Plum, L., Schubert, M., and Brüning, J.C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *16*, 59–65.
- Poulin, F., Gingras, A.C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* *273*, 14002–14007.
- Reed, A.S., Unger, E.K., Olofsson, L.E., Piper, M.L., Myers, M.G., and Xu, A.W. (2010). Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* *59*, 894–906.
- Reiling, J.H., and Hafen, E. (2004). The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev.* *18*, 2879–2892.
- Ren, H., Orozco, I.J., Su, Y., Suyama, S., Gutiérrez-Juárez, R., Horvath, T.L., Wardlaw, S.L., Plum, L., Arancio, O., and Accili, D. (2012). FoxO1 target Gpr17 activates AgRP neurons to regulate food intake. *Cell* *149*, 1314–1326.
- Rolfe, D.F., and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* *77*, 731–758.
- Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Fernandes, M.F.A., Rocco, S.A., Marin, R.M., Morari, J., Souza, K.K., Dias, M.M., Gomes-Marcondes, M.C., Gontijo, J.A.R., et al. (2008). A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* *57*, 594–605.
- Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G., and Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* *375*, 1–16.
- Sabharwal, S.S., and Schumacker, P.T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* *14*, 709–721.
- Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., and Martínez, J.A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* *64*, 35–46.
- Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P.B., and Thomas, G. (2002). Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* *277*, 20104–20112.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098–1101.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* *22*, 159–168.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *11*, 173–186.
- Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tümer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am. J. Physiol.* *273*, E226–E230.
- Schaffhauser, A.O., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, S., Criscione, L., and Hofbauer, K.G. (1997). Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* *46*, 1792–1798.
- Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.-F., Balaban, R.S., and Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* *281*, 27643–27652.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* *46*, 2119–2123.
- Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* *48*, 158–167.
- Shadel, G.S., and Horvath, T.L. (2015). Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* *163*, 560–569.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S.C. (1998). Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* *17*, 6649–6659.
- Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M., Marsh, J.P., and Mossman, B.T. (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* *266*, 24398–24403.
- Singru, P.S., Sánchez, E., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* *148*, 638–646.

- Sipula, I.J., Brown, N.F., and Perdomo, G. (2006). Rapamycin-mediated inhibition of mammalian target of rapamycin in skeletal muscle cells reduces glucose utilization and increases fatty acid oxidation. *Metabolism* 55, 1637–1644.
- Slater, T.F. (1982). Lipid peroxidation. *Biochem. Soc. Trans.* 10, 70–71.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50, 2673–2681.
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189–1192.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat. Neurosci.* 8, 1356–1363.
- Stevanovic, D., Trajkovic, V., Müller-Lüthloff, S., Brandt, E., Abplanalp, W., Bumke-Vogt, C., Liehl, B., Wiedmer, P., Janjetovic, K., Starcevic, V., et al. (2013). Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 381, 280–290.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., et al. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397–408.
- Sun, Y., Ahmed, S., and Smith, R.G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7973–7981.
- Toda, C., and Diano, S. (2014). Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 757–764.
- Tonkonogi, M., Walsh, B., Svensson, M., and Sahlin, K. (2000). Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J. Physiol.* 528 Pt 2, 379–388.
- Tonks, N.K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121, 667–670.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., et al. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.
- Varela, L., and Horvath, T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079–1086.
- Villanueva, E.C., Münzberg, H., Cota, D., Leshan, R.L., Kopp, K., Ishida-Takahashi, R., Jones, J.C., Fingar, D.C., Seeley, R.J., and Myers, M.G. (2009). Complex regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology* 150, 4541–4551.
- Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., et al. (2003). The AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 111, 91–98.
- Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., and Lawrence, J.C. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 282, 20036–20044.
- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., et al. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46, 335–341.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., and Routh, V.H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965.
- Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., and Cheng, H. (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 917–927.
- Wautman, J., and Tavernier, J. (2011). Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 16, 2771–2793.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., and Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* 74, 683–701.
- Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiol. Behav.* 86, 709–716.

- Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 851–864.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Yalcin, S., Marinkovic, D., Mungamuri, S.K., Zhang, X., Tong, W., Sellers, R., and Ghaffari, S. (2010). ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. *EMBO J.* 29, 4118–4131.
- Yang, S.-B., Tien, A.-C., Boddupalli, G., Xu, A.W., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 75, 425–436.
- Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M., and Kangawa, K. (2002). Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 391–395.
- Zampieri, T.T., Pedroso, J.A.B., Furigo, I.C., Tirapegui, J., and Donato, J. (2013). Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. *PLoS One* 8, e84094.
- Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753–1758.
- Zhu, G., Yan, J., Smith, W.W., Moran, T.H., and Bi, S. (2012). Roles of dorsomedial hypothalamic cholecystokinin signaling in the controls of meal patterns and glucose homeostasis. *Physiol. Behav.* 105, 234–241.
- Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35.